



Universidade Nova de Lisboa

**Estudo Piloto sobre a Prevalência da Doença de
Chagas em Grávidas Latino-americanas em
Portugal**

Ana Rita Filipe Ferrão

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE TROPICAL

JANEIRO DE 2012



Universidade Nova de Lisboa

Estudo Piloto sobre a Prevalência da Doença de Chagas em Grávidas Latino-americanas em Portugal

Ana Rita Filipe Ferrão

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical

ORIENTADORES: Doutor Jorge Seixas e Doutor Marcelo Silva

Este estudo teve o apoio da Organização Mundial de Saúde que ofereceu
suporte técnico na pessoa do Doutor Pedro Albajar, e das empresas *Ortho*
Clinical Diagnostics e *REM* que forneceram gratuitamente os seus
reagentes.

JANEIRO DE 2012

Dedico esta tese aos meus avós, António e Maria Teresa.

Agradecimentos

A realização deste estudo não seria possível sem o apoio de diversas pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a concretizar esta dissertação.

Um muito obrigada ao meu orientador Doutor Jorge Seixas, pela partilha de conhecimentos, pelo entusiasmo e pela paciência ao longo de um ano repleto de dúvidas e incertezas.

Muito obrigada ao meu orientador Doutor Marcelo Silva, por todo o apoio e esclarecimento de dúvidas e por toda a sua disponibilidade.

Obrigada ao Doutor Jorge Atouguia pelos seus conselhos, e pelo interesse e consentimento quanto à realização desta dissertação.

Um especial agradecimento ao Doutor Pedro Albajar por todo o seu interesse e apoio disponibilizado para a realização deste estudo desde o seu início.

Muito obrigada à Doutora Cristina Parada por todos os seus conselhos e pelo interesse em apoiar esta investigação.

Agradeço também à Doutora Olga Matos por disponibilizar o seu laboratório para a realização de possíveis ensaios de Imunofluorescência.

Obrigada ao Doutor Carlos Cardoso da *Ortho Clinical Diagnostics* e à Doutora Andréia Ferreira da empresa *REM* pela gentil oferta dos reagentes utilizados neste estudo.

Muito obrigada aos directores clínicos dos serviços hospitalares envolvidos no estudo, pela disponibilidade e interesse em autorizar a sua realização: Doutora Ana Campos e Doutor João Almeida da Maternidade Alfredo da Costa, Doutora Virgínia Loureiro (em nome da Doutora Rosa Barros) e Doutor Ricardo Mina do Hospital Dona Estefânia, e Doutora Esmeraldina Júnior e Doutor Fernando Cirurgião do Hospital de São Francisco Xavier.

Um especial agradecimento ao Doutor Luís Varandas, que graças à sua ajuda tornou possível a implementação do estudo no Hospital Dona Estefânia.

Obrigada à Doutora Liliana Barros do Hospital Dona Estefânia pela submissão do protocolo de estudo à comissão de ética e pelo seu interesse na investigação.

Muito obrigada a todos os investigadores associados pelas instituições participantes, pelo recrutamento de grávidas de risco e realização dos questionários:

Doutora Augusta Borges, Doutora Sara Rodrigues e Doutora Ana Aguiar da Maternidade Alfredo da Costa, Doutora Joana Faria do Hospital Dona Estefânia, e Doutora Denise Bacalhau e Doutor Dusan Djokovic do Hospital de São Francisco Xavier.

Obrigada às técnicas de análises clínicas responsáveis pelo armazenamento das amostras colhidas, pela sua disponibilidade em participar no estudo: Técnica Rita Franco da Maternidade Alfredo da Costa e Técnicas Olga Carvalho e Sónia Marujo do Hospital Dona Estefânia.

Agradeço ainda a todos os técnicos e administrativos da central de colheitas do Hospital de São Francisco Xavier pelo entusiasmo na comunicação da chegada de participantes e pela colheita de amostras.

Obrigada aos restantes elementos das três equipas de saúde em cada um dos hospitais participantes, pela colaboração no estudo.

Um obrigada muito especial à Catarina Farinha e ao Carlos Nazário pelo acompanhamento durante todo este período e pela paciência. Obrigada por tanto ouvirem falar sobre a Doença de Chagas.

Muito obrigada a todos!

Esta dissertação foi redigida de acordo com as regras do acordo ortográfico de 1945.

Resumo

Estudo Piloto sobre a Prevalência da Doença de Chagas em Grávidas Latino-americanas em Portugal

Ana Rita Filipe Ferrão

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e pode ser transmitida aos humanos através do insecto vector triatomíneo (apenas na América latina), de mãe para filho, por transfusão ou por transplante. Após uma fase aguda de algumas semanas de duração, a doença evolui durante décadas de forma assintomática. Cerca de 40% dos indivíduos nesta fase progridem para a fase crónica, caracterizada por insuficiência cardíaca progressiva e/ou dilatações do trato digestivo.

O deslocamento de um número cada vez mais elevado de migrantes da América Latina para a Europa faz com que a Doença de Chagas seja actualmente um problema de saúde pública nesta região. Importa conhecer a sua epidemiologia através de inquéritos serológicos de forma a permitir uma adequada e atempada actuação das autoridades de saúde. Em Portugal o número de imigrantes latino-americanas tem aumentado ano após ano, destacando-se o Brasil como país de origem. No entanto, o número de migrantes infectados por *T. cruzi* no nosso país não é conhecido, apontando as estimativas para a existência de cerca de 500 a 1000 indivíduos chagásicos. Neste estudo multicêntrico foi avaliada a prevalência da infecção por *T. cruzi* em grávidas latino-americanas em três serviços hospitalares de Lisboa, onde a percentagem de imigrantes latino-americanos é a mais elevada do país. Mais de 95% da amostra estudada é originária do Brasil. Não foram encontrados neste estudo casos positivos para Doença de Chagas. No entanto, foi possível elucidar os profissionais de saúde sobre o impacto da Doença de Chagas, avaliando a necessidade de implementação de programas de rastreio continuado.

A comparação entre testes laboratoriais corresponde a um dos métodos utilizados na validação de técnicas, sendo que em Portugal esse tipo de estudo nunca antes havia sido efectuado para a Doença de Chagas. Foi realizada uma comparação entre dois testes serológicos de rastreio (ELISA) para Doença de Chagas das empresas *REM* e *OrthoClinicalDiagnostics*. Concluiu-se que as diferenças entre os sinais obtidos não diferem significativamente.

Palavras-chave: Doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Doença Emergente; Imigração; Prevalência; Transmissão vertical.

Abstract

Pilot Study on the Prevalence of Chagas Disease on Latin-american pregnant women in Portugal

Ana Rita Filipe Ferrão

Chagas Disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and can be transmitted to humans by the vector triatomine bug (only in Latin America), from mother to child, through transfusion or transplant. After an acute phase of a few weeks of duration, the disease evolves over decades in an asymptomatic form. About 40% of the subjects at this stage progress towards the chronic phase, characterized by progressive heart failure and/or dilations of the digestive tract.

The displacement of a growing number of migrants from Latin America to Europe makes Chagas Disease currently a public health problem in this region. It is important to know its epidemiology through serological surveys in order to allow a proper and timely action by the health authorities. In Portugal, the number of Latin American immigrants has increased year after year, highlighting Brazil as the country of origin. However, the number of migrants infected with *T. cruzi* in our country is not known, pointing the estimates for the existence of about 500 to 1,000 individuals with Chagas Disease. In this multicenter study the prevalence of *T. cruzi* infection in Latin American pregnant women was evaluated in three hospitals of Lisbon, where the percentage of Latin American immigrants is the highest in the country. More than 95% of the sample studied is from Brazil. No positive cases were found positive cases for Chagas Disease in this study. Nevertheless, it was possible to elucidate the health professionals about the impact of Chagas Disease, evaluating the need for the implementation of permanent screening programs.

The comparison between laboratory tests is one of the methods used for the validation of techniques, and in Portugal this type of study had never been carried out before for Chagas Disease. A comparison was made between two serological tests (ELISA) for Chagas Disease from the manufacturers *REM* and *OrthoClinicalDiagnostics*. It was concluded that the differences between the signals obtained did not differ significantly.

Key Words: Chagas Disease; *Trypanosoma cruzi*; Emerging Disease; Immigration; prevalence; vertical transmission.

Índice

Lista de Abreviaturas	1
1 Introdução	3
1.1 <i>Doença de Chagas</i>	3
1.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.2 Epidemiologia da Doença de Chagas	6
1.2 Patogénese da Doença de Chagas	18
1.2.1 Resposta Imune Celular	19
1.2.2 Resposta Imune Humoral	20
1.2.3 Mecanismos de Evasão do Parasita	21
1.2.4 Miocardiopatia Crónica Chagásica	21
1.3 Diagnóstico de Doença de Chagas	22
1.3.1 Validação de Métodos Laboratoriais	25
1.3.2 Realização de Diagnóstico em Áreas Não Endémicas	28
1.3.3 Meios Complementares de Diagnóstico	30
1.4 Tratamento na Doença de Chagas	31
1.4.1 Tratamento Pediátrico	36
1.4.2 Avaliação Pós Terapêutica da Doença de Chagas	37
1.5 Imigração Latino-americana na Europa	37
1.5.1 Imigração em Portugal	38
1.5.2 A Doença de Chagas na Europa	41
1.5.3 Doença de Chagas em Portugal	43
1.6 Justificação e Objectivos do Estudo	44
1.6.1 Justificação do Estudo	44
1.6.2 Objectivos do Estudo	45
2 Materiais e Métodos	46
2.1 Desenho do Estudo	46

2.2	Materiais.....	46
2.3	Metodologia de Estudo	47
2.3.1	Seleção dos Hospitais Participantes	47
2.3.2	Escolha dos Testes Serológicos.....	47
2.3.3	População em Estudo	50
2.3.4	Consentimento Informado.....	50
2.3.5	Realização de Questionário para Participantes Incluídas	50
2.3.6	Colheita de Amostras	50
2.3.7	Armazenamento das Amostras.....	51
2.3.8	Transporte das Amostras.....	51
2.3.9	Realização do Teste de Rastreio.....	51
2.3.10	Realização do Teste de Confirmação	51
2.3.11	Acompanhamento Médico	52
2.3.12	Implementação do Estudo	53
2.3.13	Análise Estatística e Discussão de Resultados	55
3	Resultados e Discussão	56
3.1	Caracterização da População de Grávidas	56
3.1.1	Dimensão da Amostra	56
3.1.2	Entidades Onde Foram Recrutadas	56
3.1.3	Idade.....	57
3.1.4	Motivo de Inclusão no Estudo.....	58
3.1.5	Proveniência das Participantes	60
3.1.6	Tipo de Habitação em Área Endémica.....	65
3.1.7	Profissão das Participantes na América-latina e em Portugal	66
3.1.8	Histórico de Doença de Chagas	68
3.1.9	Intenção de Dar à Luz em Portugal	70
3.2	Prevalência da Doença de Chagas em Grávidas Latino-americanas em Portugal	73
3.3	Dificuldades Sentidas Durante o Estudo.....	74

3.3.1	Implementação do Estudo	74
3.3.2	Recrutamento de Participantes e Separação de Amostras Biológicas.....	75
3.3.3	Continuidade do Estudo	77
3.4	Ensaio Serológicos Disponíveis em Portugal	77
3.5	Utilização dos kits <i>Ortho Clinical Diagnostics</i> e <i>REM</i>	78
3.6	Comparação de Resultados Obtidos entre os Kits Utilizados	82
4	Conclusão.....	85
5	Bibliografia	87
6	Lista de Tabelas, Ilustrações, Gráficos e Equações.....	98
6.1	Lista de Tabelas.....	98
6.2	Lista de Ilustrações.....	99
6.3	Lista de Gráficos	99
6.4	Lista de Equações.....	99
7	Anexos	

Lista de Abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

APC – *antigen presenting cells*

BENEFIT - *The Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypasosomiasis project*

BNP – peptídeo natriurético tipo B

CAA – células apresentadoras de antígeno

CD – *cluster of differentiation*

DNDi – *Drugs for Neglected Diseases initiative*

DO – Densidade óptica

DTU – *discrete typing units*

ECG – electrocardiograma

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EUA – Estados Unidos da América

HAI – hemaglutinação indirecta

HDE – Hospital Dona Estefânia

HSFX – Hospital de São Francisco Xavier

IFI – imunofluorescência indirecta

IFN – interferão

IL – interleucina

LAFEPE - Laboratório Farmacêutico de Pernambuco

MAC – Maternidade Alfredo da Costa

MHC – *major histocompatibility complex*

NPA – percentagem de concordância negativa (do inglês *negative percent agreement*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PALOP – países africanos de língua oficial portuguesa

PCR – *polimerase chain reaction*

PPA – percentagem de concordância positiva (do inglês *positive percent agreement*)

RIPA – *radioimmunoprecipitation assay*

Sig. – nível de significância

TGF – *transforming growth factor*

Th – célula T *helper*

TNF – *tumor necrosis factor*

1 Introdução

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou Tripanosomíase Americana, é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), transmitida maioritariamente através de um vector invertebrado, da subfamília *Triatominae* (Maudlin et al. 2004; World Health Organization 2007a; WHO Expert Committee 2002). A doença evolui em três fases: aguda, até cerca de dois meses após infecção (World Health Organization 2010), crónica indeterminada e crónica sintomática (cardíaca e/ou digestiva), entre 10 a 30 anos após infecção (A. Rassi & José Antonio Marin-Neto 2010).

1.1.1 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um organismo diplóide, protozoário, tendo sido o seu genoma totalmente sequenciado em 2005 (El-Sayed et al. 2005; Teixeira et al. 2006). Pertencente à classe Zoomastigophora, inclui-se na ordem *Kinetoplastida*, e na família *Trypanosomatidae* (Teixeira et al. 2006). Na ordem *Kinetoplastida* encontram-se os protozoários flagelados pertencentes às espécies *Trypanosoma* e *Leishmania*, que possuem um organelo denominado cinetoplasto (Stuart et al. 2008). O cinetoplasto corresponde a uma região de ácido desoxirribonucleico (ADN) existente numa única e grande mitocôndria, perto da qual é originado o flagelo destes parasitas (Stuart et al. 2008). O cinetoplasto contém cerca de 10% a 15% do ADN total da célula, codificando genes necessários ao funcionamento da mitocôndria (Teixeira et al. 2006). Os cinetoplastídeos podem reproduzir-se assexuada e sexuadamente, conferindo-lhes a última diversidade genética, que se reflecte na patogenicidade (Stuart et al. 2008); Vago et al. 2000; Teixeira et al. 2006). A reprodução assexuada de *T. cruzi* existe em duas fases do seu ciclo evolutivo (Tomazi et al. 2009). A hipótese ainda não confirmada deste parasita também se reproduzir sexuadamente justifica a existência de uma diversidade genética que se tem evidenciado ao longo dos anos (Teixeira et al. 2006; Tomazi et al. 2009). Na tabela 1 encontram-se resumidas as características celulares de *T. cruzi*.

Tabela 1 - Características celulares de *T. cruzi*, segundo os autores de Souza, Teixeira *et al.* e Alberts *et al.*.

Estrutura celular	Função	Características
Membrana plasmática	Delimitação e protecção celular.	Três estruturas: glicocálice, bicamada lipídica e camada de microtúbulos.
Citoesqueleto	Função estrutural, separação de cromossomas durante a mitose.	Microtúbulos localizados por baixo da membrana plasmática.
Flagelo	Movimento e adesão à superfície celular nos hospedeiros vertebrados e às membranas do intestino nos hospedeiros invertebrados.	Microtúbulos e dineína.
Bolso flagelar	Ingestão de macromoléculas nas formas epimastigotas.	Depressão da superfície celular.
Vesículas endocíticas	Transporte de macromoléculas ingeridas.	Ligadas ao reservossoma.
Reservossoma	Armazenamento de macromoléculas ingeridas, utilizadas na passagem de epimastigota para tripomastigota.	Compartimento pré-lisossomal.
Lisossoma	Digestão enzimática.	Compartimento delimitado por uma membrana onde estão armazenadas enzimas digestivas.
Cinetoplasto	Codificação de genes necessários ao funcionamento da mitocôndria.	Condensação de ADN extranuclear, na mitocôndria, formando uma estrutura arredondada abaixo da base do flagelo. Compactado nas formas epimastigota e amastigota, mas disperso na forma tripomastigota.
Glicosoma	Actividade enzimática responsável pela oxidação de aminoácidos e lípidos e pelo processo glicolítico.	Redondo ou alongado.
Acidocalcissoma	Concentração de cálcio.	Estrutura ácida cujo número dentro da célula varia de acordo com ciclo celular.
Núcleo	Regulação da expressão genética.	ADN celular delimitado pelo envelope nuclear.
Nucléolo	Produção de subunidades dos ribossomas.	Agregado de macromoléculas existente no núcleo, não delimitado por membrana.
Ribossoma	Produção de proteínas através do processo de tradução de RNAm.	Duas subunidades proteicas.
Retículo Endoplasmático	Síntese e transporte de lípidos e proteínas.	Rede de túbulos e vesículas delimitada por uma membrana que pode estar associada a ribossomas.
Complexo de Golgi	Síntese de hidratos de carbono e distribuição de produtos sintetizados no retículo endoplasmático.	Sistema membranar que se encontra entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática.
Vacúolos	Armazenamento, digestão ou excreção de moléculas.	Estrutura oval delimitada por membrana.

Desde a descoberta do agente da Doença de Chagas que se foram verificando ao longo dos anos diferentes características morfológicas e genéticas de isolados de *T. cruzi*, assim como diversas formas clínicas da patologia em hospedeiros de diferentes contextos epidemiológicos (International Symposium 1999). A partir da década de 70 a população de *T. cruzi* tem vindo a ser caracterizada em subgrupos com nomenclaturas diferentes de acordo com cada autor e com as características do parasita estudadas (Zingales et al. 2009). São exemplos disso a classificação de *Trypanosoma* segundo características biológicas, bioquímicas ou genéticas em Zimodemas, Biodemas, Esquizodemas, *Clonets*, Linhagens, *Clades*, Haplotipos e *Discrete Typing Units* (DTU) (Zingales et al. 2009; Andrade & Magalhães 1997; Dias 2006).

Em 1999 foi recomendado que as populações de *T. cruzi* se agrupassem englobando tanto factores biológicos como também químicos e moleculares, levando a uma classificação baseada em dois grupos: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, restando no entanto por classificar algumas populações consideradas híbridas (Zingales et al. 2009). Através da análise de ADN mitocondrial foi, em 2006, denominado um novo grupo, *T. cruzi* III (de Freitas et al. 2006).

Em 2009 no Brasil foi recomendada uma nova classificação para *Trypanosoma cruzi*, pelo comité especializado em investigação sobre a Doença de Chagas, considerando a existência de seis grupos: *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* III, *T. cruzi* IV, *T. cruzi* V, e *T. cruzi* VI. Esta classificação engloba todas as populações conhecidas do parasita (Zingales et al. 2009).

A virulência e a patogenicidade do *Trypanosoma cruzi* estão relacionadas com a diversidade dos parasitas (Teixeira et al. 2006), uma vez que esta tem influência na distribuição tecidual do parasita no organismo do hospedeiro (Vago et al. 2000). A virulência da estirpe produz efeitos ao nível da modulação da função das células apresentadoras de antígeno (CAA, ou APC do inglês *antigen presenting cells*) (Soto et al. 2003).

O grupo *T. cruzi* I associa-se ao ciclo silvático e é encontrado principalmente mais a Norte na América do Sul e na América Central, estando mais relacionado com casos de infecção aguda e formas cardíacas de infecção crónica, considerando-se de fácil tratamento em infecção humana (Fondation Merieux & World Health Organization 2008; de Freitas et al. 2006; World Health Organization 2007b).

T. cruzi II predomina no ciclo doméstico e circula principalmente no cone Sul da América do Sul (Fondation Merieux & World Health Organization 2008; de Freitas et al. 2006; Rassi et al. 2010; World Health Organization 2007b). Encontra-se relacionado tanto com a fase aguda como crónica, mas bastante associado a cardiomiopatias severas, e de difícil tratamento (Fondation Merieux & World Health Organization 2008; Rassi et al. 2010).

Quanto a *T. cruzi* III, é encontrado em infecção humana principalmente no Brasil (Zingales et al. 2009; de Freitas et al. 2006). Os outros grupos de *T. cruzi* predominam no cone Sul da América do Sul (Zingales et al. 2009; World Health Organization 2007b).

Para além do Homem, outros animais mamíferos podem ser afectados pela Doença de Chagas, pertencentes às Ordens *Chiroptera*, *Edentata*, *Marsupialia*, *Rodentia*, *Lagomorpha*, *Carnivora* e *Primata* (Teixeira et al. 2006; WHO Expert Committee 2002). A infecção por *T. cruzi* afecta mais de 150 espécies de 24 famílias de animais domésticos e selvagens no continente americano (World Health Organization 2007a; WHO Expert Committee 2002).





Existe outro parasita pertencente à espécie *Trypanosoma* cuja distribuição se sobrepõe à de *T. cruzi* e capaz de infectar os mesmos hospedeiros que *T. cruzi*, *Trypanosoma rangeli* (World Health Organization 2007b). Este protozoário não é patogénico mas infecções mistas com *T. cruzi* são relativamente comuns em humanos (World Health Organization 2007b).

1.1.2 Epidemiologia da Doença de Chagas

O ciclo de vida de *T. cruzi* inicia-se na transmissão ao homem aquando da picada de um triatomínio vector do parasita (hospedeiro invertebrado) (Chagas 1909). O vector possui parasitas na sua forma infectante nas suas fezes e, a cada refeição (picada), ele defeca (Cook & Zumla 2009). Os parasitas infectantes, tripomastigostas metacíclicos, penetram no organismo do hospedeiro humano por acção mecânica do próprio indivíduo, ao esfregar o local da picada (Chagas 1909; Cook & Zumla 2009). Dentro do organismo humano, o parasita tem a capacidade de penetrar nas células, encontrando-se especialmente em macrófagos, células do músculo liso e estriado, e fibroblastos (Piacenza et al. 2009). Nas células tornam-se em amastigotas que se multiplicam por

fissão binária, formando quistos que acabam por sofrer uma ruptura (Chagas 1909; Cook & Zumla 2009; Stuart et al. 2008). Este ciclo intracelular replicativo dura cerca de quatro dias (Teixeira et al. 2006). Após o rebentamento celular os parasitas reaparecem na circulação sanguínea sob a forma de tripomastigotas, podendo penetrar novas células ou permanecer em circulação (Stuart et al. 2008). As formas amastigotas podem persistir no corpo do hospedeiro durante décadas nas células do tecido muscular (Teixeira et al. 2006). É possível infectar um vector que se alimente na fase em que os parasitas se encontram em circulação (Chagas 1909; Cook & Zumla 2009). Após a ingestão de tripomastigotas com o sangue do hospedeiro vertebrado, no aparelho digestivo do vector dá-se a replicação de formas não infectantes do parasita, epimastigotas (Piacenza et al. 2009; Stuart et al. 2008). Estes migram para o recto e sofrem nesse local alterações biológicas (metaciclogénese) que levam à formação de formas infectantes e não replicativas do parasita, tripomastigotas metacíclicos (Piacenza et al. 2009). Na tabela 2 encontram-se resumidas as características estruturais do parasita em cada fase do ciclo de vida. No entanto, as suas características podem variar de acordo com a estirpe do parasita, a fase de infecção, e a espécie do hospedeiro (Sousa 1999).

Tabela 2 – Características estruturais das formas evolutivas de *T. cruzi* segundo os autores De Sousa, Chagas, Marin-Neto e Maudlin. Imagens extraídas de Bern et al. 2007, de <http://www.fcfrp.usp.br/> e de <http://dna.kdna.ucla.edu/>.

Forma Evolutiva	Características
Tripomastigotas metacíclicos 	Finos, flagelados, 17 a 22 µm de comprimento, cinetoplasto grande, redondo e subterminal.
Amastigotas 	Sem flagelo, forma esférica, pequeno cinetoplasto.
Tripomastigotas 	Flagelados, comprimento total de 16,3 a 21,8 µm, cinetoplasto subterminal. Apresentando forma de “C”, podem ser finos, muito largos ou intermédios.
Epimastigotas 	Flagelados, alongados, apresentando o cinetoplasto numa localização central, perto do núcleo.

Existe um grande número de reservatórios vertebrados e de insectos triatomíneos que participam na transmissão desta doença, tornando complexa a sua epidemiologia e o seu controlo (World Health Organization 2007a).

A transmissão do parasita pode ocorrer também através de transfusão sanguínea, transmissão vertical (Reiche et al. 1996), amamentação, transplante de órgãos (WHO Expert Committee 2002), ou por penetração pela conjuntiva, mucosa oral ou nasal (Cook & Zumla 2009). Os acidentes laboratoriais são também apontados como uma importante forma de transmissão do parasita (World Health Organization 2009b). É crescente o número de casos de infecção por via oral, por contaminação de alimentos consumidos *in natura* contendo o parasita, nomeadamente em sumos (Dias 2006).

Encontram-se em curso há várias décadas estudos com o objectivo de desenvolver uma vacina que previna esta doença (Panzer et al. 2004). As dificuldades encontradas nesta área relacionam-se essencialmente com a variabilidade genética entre estirpes de *T. cruzi*, com algumas questões éticas que se prendem com a sua utilidade em função do diagnóstico tardio da patologia, e também com questões económicas uma vez que se

trata de uma doença negligenciada (Stuart et al. 2008; Fondation Merieux & World Health Organization 2008).

Em áreas não endémicas a transmissão do Tripanosomíase Americana ocorre principalmente através de transfusões e transmissão vertical (Schmunis 2007).

1.1.2.1 *Evolução Clínica da Doença*

Existem manifestações clínicas na fase aguda e na fase crónica; no entanto a maioria dos doentes que se encontra em fase indeterminada não apresenta sintomas e não sabe estar infectado, podendo transmitir a infecção por via congénita, doação de sangue ou órgão (Dias et al. 1956).

A primeira fase tende a ocorrer nos primeiros anos de vida, sendo verificados sintomas inespecíficos como febre, mal estar geral, dores musculares, anorexia, e em alguns casos diarreia e vómitos. Como sinais localizados encontram-se geralmente edema, aumento dos nódulos linfáticos, hepatomegália e esplenomegália (WHO Expert Committee 2002). O sinal de Romaña (ilustração 1), uma conjuntivite unilateral como resultado da entrada do parasita por penetração do parasita na conjuntiva ocular, tem sido utilizado desde a descoberta da doença para o reconhecimento de novos casos em área endémica (Laranja et al. 1948). Na fase aguda da doença os parasitas, sob a forma de amastigotas, poderão encontrar-se em fibroblastos, células Schwann e células gliais, afectando os neurónios de forma secundária (Teixeira et al. 2006).

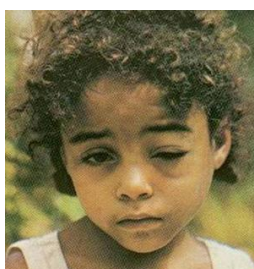


Ilustração 1 – Sinal de Romaña (extraído de <http://www.etsu.edu/com/>).

Através da realização de electrocardiograma poderão ser observados na fase aguda fenómenos como: taquicardia sinusial, bloqueio auriculo-ventricular de primeiro grau, baixa voltagem no complexo de ondas QRS e mudanças primárias na onda T. A

realização de radiografia pode em alguns casos evidenciar um aumento na silhueta cardíaca (Teixeira et al. 2006).

Após a infecção aguda verifica-se uma grande diminuição do número de parasitas em circulação e este é encontrado principalmente na sua forma intracelular nos órgãos alvo: coração, sistema nervoso central, sistema nervoso autónomo, e sistema digestivo (placas de *Peyer* e sistema de condução nervoso do trato digestivo) (WHO Expert Committee 2002). A persistência do parasita nestes órgãos, associada a determinados tipos de resposta imune poderá levar a complicações cardíacas e digestivas décadas depois, na fase crónica da doença (WHO Expert Committee 2002).

No entanto, cerca de 70% dos indivíduos infectados não apresenta sintomas da doença (World Health Organization 2007a). A Doença de Chagas caracteriza-se pela existência de uma fase assintomática denominada fase indeterminada, que corresponde a um período prolongado de aparente cura clínica durante o qual a doença progride silenciosa e sub-repticiamente (Laranja et al. 1948). Durante esta fase da doença, o aparecimento de variadas lesões em órgãos internos, principalmente no coração, podem levar à ocorrência de morte súbita por arritmia cardíaca (World Health Organization 2010; Jr. et al. 2001). Na ocorrência de morte por falha cardíaca é comum a existência de uma afectação cerebral causada por trombos originários no ventrículo esquerdo (Carod-Artal & Gascon 2010). Nesta fase a demonstração parasitológica é difícil, mas a pesquisa de anticorpos IgG é positiva (Teixeira et al. 2006).

A fase crónica sintomática da Doença de Chagas ocorre cerca de 10 a 30 anos após a infecção inicial (Rassi & Marin-Neto 2010). Durante a fase crónica, após vários anos de uma fase assintomática, considera-se que cerca de 20% a 30% dos doentes poderão desenvolver sintomas cardíacos, ao passo que cerca de 5% a 10% poderão desenvolver sintomas digestivos (World Health Organization 2009a).

Destaca-se em termos de importância clínica a miocardite chagásica crónica, que leva em muitos casos à ocorrência de fenómenos trombo-embolíticos, aneurismas ventriculares e à morte súbita (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2005; Mady & Nacrueth 1995). Qualquer um destes fenómenos poderá surgir sem existência de sintomatologia precedente, ou com sintomas que não são valorizados pelo doente ou pelo médico. A doença poderá progredir até um ponto em que a única opção é o transplante cardíaco (World Health Organization 2007a).

Nesta fase, a existência de uma miocardite progride lentamente até causar a dilatação das câmaras cardíacas, levando à disfunção contráctil do coração (Rassi & Marin-Neto 2010).

Na fase crónica podem ser observadas anomalias electrocardiográficas variadas, sendo que o bloqueio do ramo direito associado a hemibloqueio do ramo esquerdo é sugestivo de miocardiopatia crónica chagásica (Teixeira et al. 2006).

O aparecimento de alterações na trato gastrointestinal, com a existência de dilatação no esófago e no intestino grosso (megaesófago e megacólon) é também característico da fase crónica da doença, causando disfagia, regurgitação ou obstipação, levando em alguns casos a malnutrição e obstrução intestinal (Rassi & Marin-Neto 2010; Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2005). Esta dilatação ocorre devido a lesões nas vias nervosas que controlam a actividade motora no sistema digestivo (World Health Organization 2007a).

Em alguns casos os sintomas cardíacos e digestivos podem ocorrer simultaneamente (World Health Organization 2007a).

Vários pesquisadores demonstraram o comprometimento do sistema nervoso central principalmente durante a fase aguda da Doença de Chagas e na ocorrência de reactivações por imunossupressão. Na fase crónica demonstrou-se o comprometimento do sistema nervoso periférico e central (a nível cerebelar e psiquiátrico), devido a alterações verificadas na mielina (WHO Expert Committee 2002; Teixeira et al. 2006).

1.1.2.2 Prevalência da Doença de Chagas

As áreas endémicas da transmissão deste parasita, onde existem insectos infectados responsáveis pela transmissão vectorial estão limitadas à América Central e Sul (WHO Expert Committee 2002). Fora destas áreas endémicas, a Doença de Chagas vem assumindo uma importância crescente, em função do aumento no fluxo emigratório de latino-americanos (WHO Expert Committee 2002; World Health Organization 2009b). Na última década, em particular na Europa, a Doença de Chagas vem sendo reconhecida como um problema emergente de saúde pública (WHO Expert Committee 2002; World Health Organization 2009b).

Na região central do continente americano são registadas zonas endémicas em Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua e Panamá (World Health Organization 2010). Na América do Sul existem zonas consideradas

endêmicas no Suriname, Guiana, Guiana Francesa, Colômbia, Venezuela, Argentina, Chile, Ecuador, Paraguai, Perú, Uruguai, Bolívia e Brasil (World Health Organization 2010). No Brasil existe uma taxa de prevalência de Doença de Chagas de cerca de 1% (Organización Panamericana de la Salud 2006; Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2005). No mesmo país, as zonas que representam o maior número de óbitos devidos a Doença de Chagas correspondem aos estados de Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraná, Minas Gerais e São Paulo, mas a doença está presente em todos os estados (Drumond & Marcopito 2006). Estima-se que a prevalência da doença em toda a zona endêmica latino-americana seja cerca de 1,4%, correspondente a 8 milhões de indivíduos (Rassi & Marin-Neto 2010), e que em países não-endêmicos existam entre 63 000 a 360 000 indivíduos infectados, dependendo do número de imigrantes ilegais em cada país não-endêmico (Schmunis 2007).

A prevalência da Doença de Chagas nos diferentes países onde é endêmica é apresentada no gráfico 1.

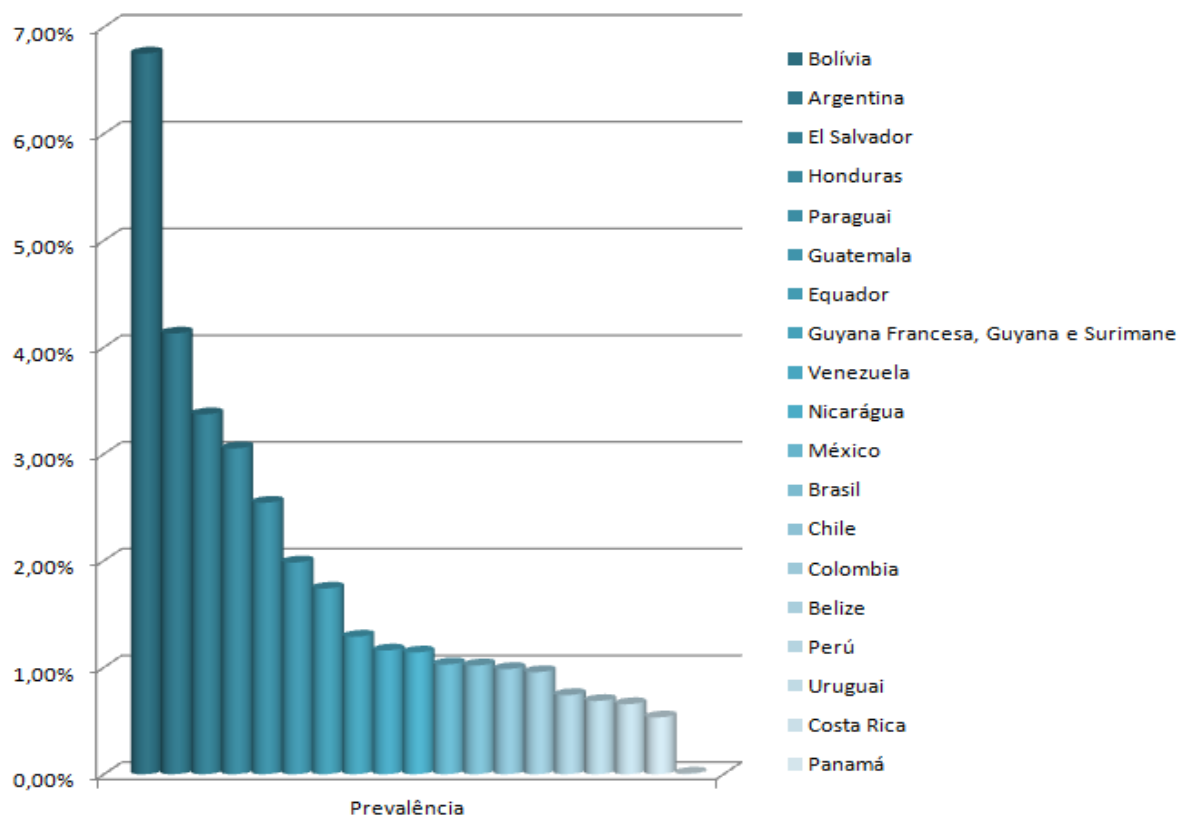


Gráfico 1 – Prevalência da Doença de Chagas nos países endêmicos segundo dados de 2006 da *Organización Panamericana de la Salud*.

A Doença de Chagas apresenta maior incidência de transmissão vectorial nas zonas rurais e mais empobrecidas da região endémica, e é muito associada a pobreza (World Health Organization 2007a). Este facto deve-se ao *habitat* favorável do vector do parasita (Chagas 1909; World Health Organization 2008). O Triatomíneo vive preferencialmente em reentrâncias de paredes e telhados de habitações mais desfavorecidas, rurais ou na periferia de zonas urbanas (Chagas 1909; World Health Organization 2008). Este insecto é um hematófago, que tende a viver perto do Homem, onde obtém o seu sangue como alimento, normalmente durante a noite (Chagas 1909; World Health Organization 2008). Assim, a Doença de Chagas está bastante associada a um estatuto social mais baixo, levando em alguns locais à existência de discriminação social perante os doentes (Magnani et al. 2009).

1.1.2.3 O Vector *Triatomíneo*

O vector da Doença de Chagas, habitualmente denominado triatomíneo, pertence à ordem *Hemiptera*, subordem *Heteroptera*, família Reduviidae, subfamília Triatominae (Schofield & Galvão 2009; Teixeira et al. 2006). Esta subfamília classifica-se em 15 Géneros e 140 espécies conhecidas, distribuídas pelo continente americano, entre os Estados Unidos da América (EUA) e o Sul da Argentina (Schofield & Galvão 2009; Teixeira et al. 2006).

Os triatomíneos são hematófagos obrigatórios dada a sua necessidade de ferro ionizado (Fe^{2+}) existente na molécula de hemoglobina (Teixeira et al. 2006), e são normalmente activos durante a noite (WHO Expert Committee 2002).

Considera-se que pelo menos 40 espécies de triatomíneos são hospedeiras para *T. cruzi*, embora todas as espécies possuam potencial para transmitir a infecção (Teixeira et al. 2006).

As principais espécies responsáveis pela transmissão de Doença de Chagas são *Panstrongylus megistus* (*P. megistus*), *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*), *Triatoma brasiliensis* (*T. brasiliensis*), *Triatoma dimidiata* (*T. dimidiata*), *Triatoma infestans* (*T. infestans*) e *Rhodnius pallescens* (*R. pallescens*) (WHO Expert Committee 2002; Schofield 2000). *T. infestans* representa a espécie que melhor se adaptou aos domicílios,

e tem sido o maior responsável pela transmissão vectorial de Doença de Chagas (Panzer et al. 2004).

Na ilustração 1 encontra-se a distribuição das principais espécies responsáveis pela transmissão vectorial de *T. cruzi*, por país, em zona endémica.



Ilustração 2 – Principais espécies de triatomíneos transmissoras de *T. cruzi*, por país, em área endémica segundo dados de Schofield e da Organização Mundial de Saúde, publicados em 2000, 2002 e 2007.

Na segunda metade do século XX verificou-se uma adaptação dos vectores às áreas periurbanas, devido a movimentos migratórios (Velarde-Rodríguez et al. 2009). Como principal vector da América do Sul e pela sua elevada capacidade de domiciliação, a espécie *T. infestans* é a que mais atenção tem tido por parte dos programas de controlo vectorial (World Health Organization 2007a).

A erradicação da Doença de Chagas não é possível, dado tratar-se de uma zoonose (World Health Organization 2007a). Os programas de controlo vectorial têm por isso

como objectivo eliminar ou diminuir as populações de vectores existentes no continente americano, principalmente das espécies domésticas (World Health Organization 2007a).

O controlo vectorial iniciou-se há mais de 40 anos e tem tido algum sucesso sobretudo porque os triatomíneos se reproduzem lentamente e as populações domiciliadas têm uma baixa variabilidade genética (World Health Organization 2007a). Actualmente existem iniciativas multinacionais de controlo vectorial que têm alcançado sucesso, nomeadamente a “*Southern Cone Initiative*”, “*Central American Initiative*”, “*Andean Pact Initiative*” e a “*Amazonian Initiative*”, patrocinadas pela Organização Mundial de Saúde (Organización Panamericana de la Salud 2006; World Health Organization 2011). Desta forma, desde os anos 90 tem decrescido o número de infecções transmitidas por *T. infestans* na América do Sul, especialmente no Brasil, Chile e Uruguai, e de *R. prolixus* na América Central (World Health Organization 2011; World Health Organization 2007a; World Health Organization 2007b; WHO Expert Committee 2002).

O Chile declarou-se livre de transmissão vectorial de Doença de Chagas em 1999 (WHO Expert Committee 2002; Organización Panamericana de la Salud 2006), e o Uruguai em 1997 (WHO Expert Committee 2002). Embora não declarem actualmente casos de transmissão vectorial, a prevalência da doença em conjunto com a existência de outras formas de transmissão leva a que esses territórios não deixem de ser considerados países endémicos (World Health Organization 2011; Organización Panamericana de la Salud 2006). Em 2006 o Brasil declarou a interrupção de transmissão por *T. infestans* (World Health Organization 2007b).

As estratégias utilizadas não geram os mesmos efeitos em todas as regiões nem com todas as espécies, devido principalmente à transmissão zoonótica em ambiente silvestre, à diversidade de reservatórios, às carências de recursos, e à falta de continuidade dos programas de controlo (World Health Organization 2007a). Para além destas dificuldades, muitos insecticidas e pesticidas utilizados no controlo vectorial são ainda prejudiciais à saúde humana, pelo que os seus riscos e benefícios deverão ser avaliados antes da sua utilização (World Health Organization 2011).

1.1.2.3.1 Resposta Imune no Vector

Os mecanismos imunes dos Triatomíneos no que respeita à infecção por *T. cruzi* encontram-se pouco estudados (Vallejo et al. 2009). No entanto, considera-se que alguns mecanismos que ocorrem no intestino e hemolinfa do insecto possam inibir o desenvolvimento de algumas estirpes do parasita (Vallejo et al. 2009; Silva 2002), nomeadamente a acção de lisosimas, lectinas, factores tripanolíticos, activação do sistema profenoloxidase, fagocitose, micro-aglutinação, produção de óxido nítrico e superóxido (Vallejo et al. 2009).

1.1.2.4 Transmissão Transfusional e por Transplante

A existência de *T. cruzi* na circulação sanguínea de um indivíduo dador de sangue pode levar a que indivíduos não infectados possam vir a sofrer de Doença de Chagas após a recepção de uma unidade de sangue (World Health Organization 2007b).

A possibilidade de transmissão de *T. cruzi* através de transfusão sanguínea foi colocada pela primeira vez em 1936, sendo que alguns anos mais tarde foi proposta a utilização do corante violeta de genciana como agente profilático nos bancos de sangue (Morel 1999).

O risco de transmissão do parasita através de transfusão é de 10% a 20% por cada unidade de 500mL de sangue total transfundido (World Health Organization 2007a), e a sua ocorrência depende de factores como a concentração de parasitas no sangue do dador, o componente sanguíneo a ser transfundido, e a estirpe do parasita (Rassi & Marin-Neto 2010). É considerada perigosa a transfusão não só de sangue total, como também de concentrados eritrocitários, plaquetas, leucócitos, plasma e crioprecipitados (Schmunis 2007).

Em países endémicos a transmissão de *T. cruzi* pela via transfusional tem merecido mais atenção na última década (Schmunis 2007). O risco de transmissão por transfusão nestes países para a Doença de Chagas tem vindo a diminuir dada a introdução de medidas de controlo na América Latina (World Health Organization 2011), existindo actualmente uma norma oficial para triagem serológica de dadores de sangue, embora a cobertura não seja de 100% em todos os países (World Health Organization 2007a). No Brasil foi redigida a primeira portaria que menciona a

realização de rastreios para Doença de Chagas ao dadores de sangue no ano de 1969 (Santos, Luiz et al. 1991).

O número de pessoas com Doença de Chagas tem vindo a aumentar nos EUA, Canadá, Austrália, Japão e na Europa, o que leva a crer que exista um risco associado de transmissão via transfusão sanguínea ou transplante de órgãos nestas áreas (World Health Organization 2008; World Health Organization 2009a). Dado o aumento do número de Latino-americanos a residir na Europa, considera-se necessária a avaliação da necessidade de implementação de programas de rastreio para dadores em risco nos bancos de sangue (Piron et al. 2008; Schmunis 2007).

A transmissão de *T. cruzi* associada a transfusão sanguínea ou transplante de órgãos foi já documentada em países como os EUA, Espanha, Canadá e Suíça (Piron et al. 2008; Gascon et al. 2009; Guerri-Guttenberg et al. 2008) .

Existe desde 2006 uma directiva europeia publicada pelo Parlamento Europeu que sugere a realização de um rastreio de dadores de sangue e órgãos para a infecção por *T. cruzi* tendo em consideração o seu historial epidemiológico (Comissão das Comunidades Europeias 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a realização de rastreios de prevenção da transmissão de *T. cruzi* por transfusão sanguínea e transplante de órgãos tanto em área endémica como em países não endémicos (World Health Organization 2008; Fondation Merieux & World Health Organization 2008; World Health Organization 2010).

1.1.2.5 Doença de Chagas Congénita

A transmissão congénita de *T. cruzi* pode ocorrer tanto em casos em que a grávida sofre de Doença de Chagas aguda como crónica, incluindo a indeterminada (Bittencourt 1992).

Em 2006 estimou-se a ocorrência de 14 385 casos de transmissão congénita por ano em área endémica. No mesmo ano foi estimada no Brasil uma incidência de casos congénitos perto de 0,135 por cada 100 nascimentos por ano (Organización Panamericana de la Salud 2006).

Os fenómenos biológicos que ocorrem na transmissão congénita ainda não se encontram bem estudados (Hermann et al. 2004). Sabe-se que a gravidez induz um grau

de depressão imunológica de forma a que o feto não seja rejeitado pelo organismo materno, o que pode levar a uma maior susceptibilidade à ocorrência de infecções em geral (Mor 2006). A transmissão congénita de *T. cruzi* encontra-se associada principalmente à existência de cargas parasitárias maternas elevadas, devido às alterações imunológicas características da gravidez (Hermann et al. 2004). Outros factores que podem estar associados à transmissão congénita são a existência de níveis baixos de monócitos e células T activadas, e a redução da produção de IFN γ (Hermann et al. 2004). A produção diminuída de IFN γ verifica-se principalmente em mães mais jovens e com um número mais baixo de gravidezes anteriores (Hermann et al. 2004). A transmissão congénita poderá depender ainda de outros factores individuais de cada grávida, a nível placentar e sistémico (Torrìco et al. 2004; World Health Organization 2007).

Em área endémica não se verificam associações entre a ocorrência de aborto ou a frequência de prematuridade e a infecção chagásica materna (Alonso et al. 1966; Castilho & Silva 1976).

Na infecção vertical, o recém-nascido poderá manifestar sinais e sintomas, tais como anemia grave, edema, convulsões, hepatosplenomegália ou ainda lesões cardíacas, oculares, ou no sistema nervoso central (Nisida et al. 1999; Fondation Merieux & World Health Organization 2008). No entanto, quando não existe transmissão ao recém-nascido, a infecção crónica da mãe em nada se relaciona com o estado de saúde do filho (Torrìco et al. 2004).

Durante a fase de aleitamento materno o risco de transmissão associa-se à fase da doença materna, verificando-se uma associação directa entre a transmissão e a fase aguda materna, enquanto que o risco na fase crónica materna apenas se relaciona com a existência de sangramento mamilar (Bittencourt 1992).

1.2 Patogénese da Doença de Chagas

T. cruzi entra nas células do sistema monócito-fagocitário por fusão, internalizando-se no fagolisossoma. Através da estimulação de citocinas pró-inflamatórias é induzida a síntese de óxido nítrico que reage com radicais superóxido, promovendo um *stress* oxidativo para o parasita, especialmente nas primeiras horas de

infecção (Piacenza et al. 2009). Desta forma, o teor em enzimas antioxidantes do parasita está directamente relacionado com a sua virulência, e com a parasitémia (Piacenza et al. 2009). O meio ácido do fagolisossoma em que se encontra o *T. cruzi* torna activa uma proteína que lhe permite sair do vacúolo e persistir no citoplasma na sua forma amastigota, resistindo assim aos efeitos digestivos do fagolisossoma (Teixeira et al. 2006).

1.2.1 Resposta Imune Celular

Os antígenos do parasita são reconhecidos pelo organismo do hospedeiro através da apresentação pelas CAA aos linfócitos T via *major histocompatibility complex* (MHC) de classe II, levando a uma resposta imune mediada por células (Andrade 2009). A apresentação pode ser efectuada através de células B, células dendríticas da pele e da medula ou monócitos (Burmester & Pezzutto 2005). O complexo péptido-MHC II induz a activação e proliferação de células T, principalmente devido à secreção de *tumor necrosis factor* (TNF) α pela célula apresentadora (Burmester & Pezzutto 2005).

Na infecção por *T. cruzi* ocorre uma activação das células T *helper* (Th) 1 originando processos inflamatórios pela produção de interferão (IFN) γ (Burmester & Pezzutto 2005; Fondation Merieux & World Health Organization 2008). A proliferação deste tipo de resposta estimula a diferenciação exagerada de células T citotóxicas e a proliferação de macrófagos com capacidade tripanocida (devido à produção de óxido nítrico) (Fondation Merieux & World Health Organization 2008; Guedes et al. 2009; Burmester & Pezzutto 2005). Este mecanismo necessita de uma regulação através de uma resposta Th2 com produção de citocinas anti-inflamatórias: IL-4, IL-10 e *transforming growth factor* (TGF) β (Guedes et al. 2009; Burmester & Pezzutto 2005). A resposta Th2 encontra-se relacionada com a replicação de *T. cruzi* e a uma diminuição da actividade dos macrófagos (A. Rassi & José Antonio Marin-Neto 2010). Verifica-se que na forma indeterminada da Doença de Chagas existe um aumento na produção de IL-10, IL-4 e TGF β , e uma diminuição na produção de IFN γ e TNF α , enquanto que na fase crónica sintomática cardíaca acontece o oposto, com uma menor actividade supressora das células T reguladoras (Guedes et al. 2009; Burmester & Pezzutto 2005; Fondation Merieux & World Health Organization 2008). A multiplicação de amastigotas de *T. cruzi* (forma intracelular) origina ainda uma ruptura

das células cardíacas e a produção de citocinas inflamatórias: IFN γ , TNF α e TGF β (Andrade 2009).

1.2.2 Resposta Imune Humoral

A presença de anticorpos (produzidos pelas células B) no sangue dos indivíduos infectados com *T. cruzi* leva a que a sua detecção seja considerada um meio de diagnóstico e terapêutica muito útil, uma vez que a parasitémia está presente apenas em menos de 50% dos pacientes em fase crónica (Burmester & Pezzutto 2005; Fondation Merieux & World Health Organization 2008).

A presença de anticorpos e a classe a que correspondem varia de acordo com a fase em que se encontra a infecção (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social 2007; Bógus 2007).

Durante a fase aguda existe uma predominância de imunoglobulinas da classe IgM, sendo que na fase crónica existe predominância de classe IgG (WHO Expert Committee 2002). Em doentes não tratados, pensa-se que o nível de parasitémia desça como consequência do atingimento de um equilíbrio entre o parasita e a resposta imune da pessoa infectada (WHO Expert Committee 2002). Este equilíbrio pode durar até ao final da vida do paciente, sendo sempre detectados no sangue anticorpos IgG (WHO Expert Committee 2002).

Alguns estudos demonstraram que quando existe uma regressão da doença é verificado um decréscimo no título de anticorpos, assim como um aumento dos seus níveis em caso de progressão (Zauza & Borges-Pereira 2001). Desta forma verificou-se que existe uma associação directa entre os níveis de anticorpos específicos para *T. cruzi* e o desenvolvimento da miocardiopatia crónica chagásica (Zauza & Borges-Pereira 2001). Foi também já demonstrado que quando, após realização de tratamento, a gravidade clínica diminui, ocorre um decréscimo no título de IgG, sugerindo uma possível cura parasitológica (WHO Expert Committee 2002). A detecção de anticorpos IgM não é muito aconselhada devido a reacções cruzadas com factor reumatóide (World Health Organization 2007b).

A detecção de anticorpos em recém-nascidos com a finalidade de diagnosticar uma infecção congénita não é aconselhável, uma vez que poderão ser detectados no sangue da criança anticorpos maternos (Fondation Merieux & World Health

Organization 2008). Assim, no que respeita a testes laboratoriais de detecção de anticorpos em caso de suspeita de transmissão congénita (mãe infectada com *T. cruzi*), devem ser efectuados na criança seis meses após o nascimento (Fondation Merieux & World Health Organization 2008; World Health Organization 2007b).

1.2.3 Mecanismos de Evasão do Parasita

T. cruzi possui a capacidade de resistir ao potencial oxidativo dos radicais superóxido da célula fagocítica, devido à produção de uma enzima, ferro superóxido dismutase, pela mitocôndria (Piacenza et al. 2009). Ocorre uma reacção química que origina peróxido de hidrogénio, que ao combinar-se com iões metálicos leva à formação de radicais hidroxilo, cuja toxicidade para o parasita é muito baixa quando comparada com o efeito dos radicais superóxido (Piacenza et al. 2009; Voet & Voet 2004).

Como mecanismo de evasão considera-se também a capacidade que o parasita tem de diminuir a estimulação de moléculas de *cluster of differentiation* (CD) 80 e CD86 e a sua interacção com CD28, indispensável para a activação da célula T (Guedes et al. 2009; Burmester & Pezzutto 2005). Consegue ainda levar a um aumento da produção de CTLA-4 ou PD-1, moléculas que competem com CD28 e têm a capacidade de terminar a activação da célula T (Guedes et al. 2009; Burmester & Pezzutto 2005).

Na fase aguda da doença, embora existam muitos parasitas nos diferentes órgãos e no sangue, graças à resposta imune adaptativa a parasitémia é controlada, mas não erradicada, pelo que poderá aumentar numa situação de declínio do sistema imune (Soares et al. 2001).

1.2.4 Miocardiopatia Crónica Chagásica

Existem diversas teorias explicativas para a patogénese da Cardiopatia Crónica Chagásica, sendo duas das mais estudadas a persistência do parasita e a ocorrência de fenómenos auto-imunes. Há evidências de que ambas as teorias são importantes na evolução da doença (Soares et al. 2001; WHO Expert Committee 2002).

A primeira teoria mencionada prende-se com a persistência de DNA de *T. cruzi* e dos seus antígenos em corações de doentes com cardiopatia crónica chagásica, ao mesmo tempo que persistem células T CD8 neste estadio da Doença de Chagas (WHO Expert Committee 2002; Teixeira et al. 2006; Gironès & Fresno 2003). Assim, muitos

autores consideram que os fenómenos imunes directamente associados ao parasita são os responsáveis pela gravidade da cardiopatia (Gironès & Fresno 2003; Medei et al. 2008). Com a persistência das células T CD8 devido à presença constante do parasita, é estimulada a libertação de citocinas que levam à ocorrência de danos no órgão cardíaco (WHO Expert Committee 2002; Gironès & Fresno 2003).

Na fase crónica da Doença de Chagas os anticorpos específicos que fixam o complemento e lisam os tripomastigostas sanguíneos contribuem para que a infecção seja nesta altura latente (Teixeira et al. 2006). Esta fase é assim caracterizada por uma escassez de parasitas (Gironès & Fresno 2003). Vários estudos indicam que a patogénese da cardiomiopatia crónica estará relacionada com fenómenos auto-imunes causada pela existência de uma quantidade mínima de parasitas no coração (Andrade 2009). Estes fenómenos são descritos devido a mimicidade entre o parasita e antígenos do próprio hospedeiro, por partilharem epítomos antigénicos (Gironès & Fresno 2003; Cunha-Neto et al. 1996): a miosina é molecularmente mímica da proteína B13 de *T. cruzi* (Cunha-Neto et al. 1996). A infecção causa destruição tecidular que origina a libertação de autoantígenos, activando-se assim Linfócitos T autoreactivos contra a miosina nas lesões cardíacas (Gironès & Fresno 2003; Medei et al. 2008). Desta forma, considera-se que exista uma miocardite linfocitária, não associada à quantidade de parasitas, traduzindo-se numa reacção de hipersensibilidade retardada (WHO Expert Committee 2002). Vários estudos demonstraram não só a presença de células T secretoras de grandes quantidades de IFN γ que reagem com miosina e B13, mas também a existência de anticorpos anti-miosina e B13 (Soares et al. 2001).

1.3 Diagnóstico de Doença de Chagas

Não existe até hoje uma técnica que seja considerada de referência para o diagnóstico da Tripanosomíase Americana (Flores-chávez et al. 2007; Otani et al. 2009). No entanto, a OMS preconiza que um diagnóstico definitivo de Doença de Chagas crónica é aceite se dois testes serológicos diferentes revelarem um resultado positivo, funcionando o primeiro como teste de rastreio e o segundo como teste confirmatório (WHO Expert Committee 2002). Segundo normas aprovadas no que respeita aos testes imunológicos para doenças infecciosas, foi estabelecido que um teste

de rastreio deverá apresentar uma sensibilidade o mais elevada possível, e que num teste confirmatório a alta especificidade será a condição mais importante (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2001).

Em caso de suspeita de doença aguda consider-se útil a realização de exame a fresco ou corado de esfregaço de sangue, para observação directa do parasita (WHO Expert Committee 2002). Outra forma de detecção directa do parasita é efectuada recorrendo ao Xenodiagnóstico, uma técnica introduzida em 1914 (Reiche et al. 1996), que consiste em fazer com que vectores não infectados se alimentem dos pacientes, analisando posteriormente as fezes do Triatomíneo (Dias et al. 1956). Encontra-se no entanto provado que a frequência de Xenodiagnósticos positivos diminui com a cronicidade da doença (Reiche et al. 1996), não sendo esta técnica utilizada em zonas não endémicas (Le Loup et al. 2009). O Xenodiagnóstico é considerado um ensaio dispendioso, e têm vindo a ser demonstrados diversos problemas técnicos relacionados com a sua utilização (Filho et al. 1995).

Como técnica para detecção do parasita, a *Polimerase Chain Reaction* (PCR) é aplicada na fase aguda ou crónica da doença, quer para detecção de infecção congénita, acompanhamento de pacientes após tratamento ou reactivação da doença, e ainda para a realização de estudos epidemiológicos (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). A PCR encontra-se em progresso, para que possa no futuro vir a ser de fácil utilização e fornecer resultados quantitativos (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). Estudos já demonstraram que a PCR é mais sensível do que a detecção directa do parasita (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). Para a fase crónica este método é no entanto limitado, devido à baixa parasitémia que existe nessa fase da doença (Otani et al. 2009).

São utilizados actualmente para a fase crónica da doença testes de Hemaglutinação Indirecta (HAI), Imunofluorescência Indirecta (IFI) e *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (WHO Expert Committee 2002). Entre os testes mencionados, considera-se o de HAI como o que apresenta um pior desempenho (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). O teste de ELISA indirecto é o que de uma forma geral demonstra as maiores percentagens de sensibilidade, sendo por isso o mais adequado como teste de rastreio (Flores-Chávez et al. 2009; Clinical and

Laboratory Standards Institute 2008). Na ilustração 3 encontra-se resumida a metodologia de um ensaio ELISA indirecto.

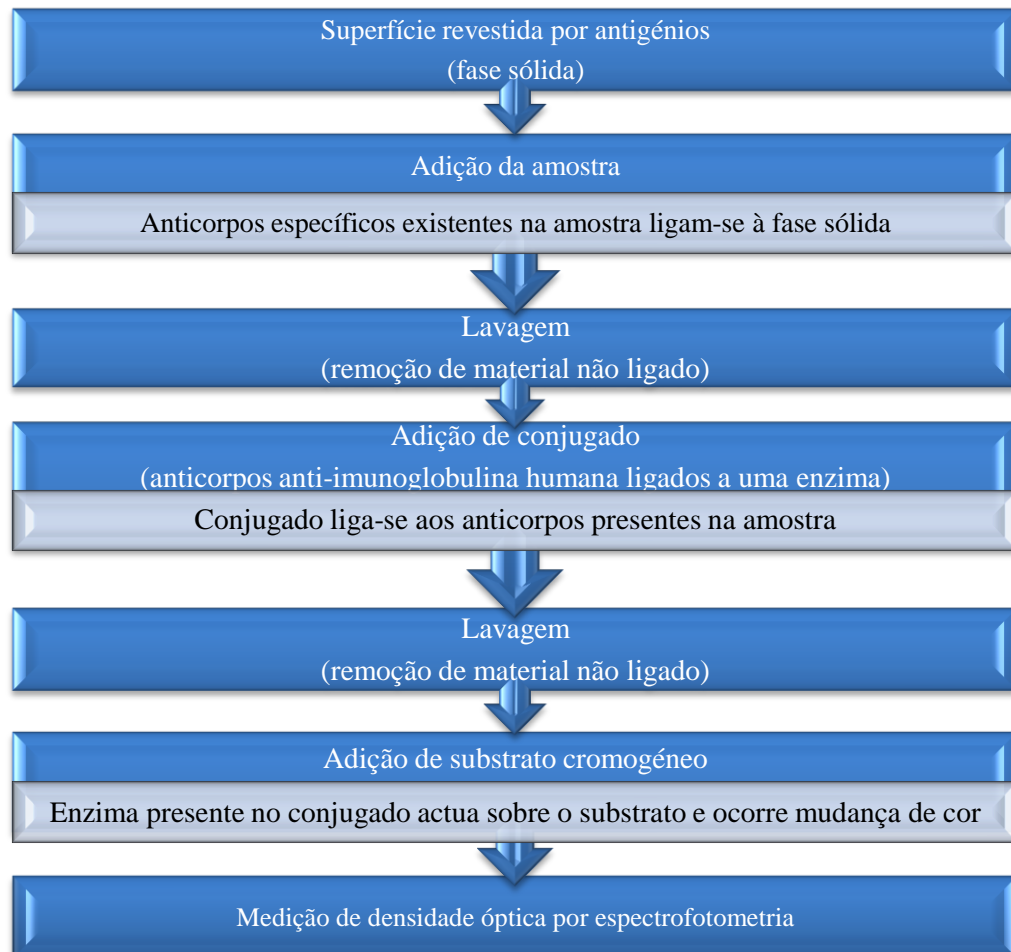


Ilustração 3 – Metodologia de um ensaio ELISA indirecto adaptado de Burmester e Pezzutto, 2005.

Um bom teste de diagnóstico deverá ter excelentes resultados tanto no que respeita a sensibilidade como a especificidade (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008), e foi já demonstrado que a IFI apresenta estas características (Otani et al. 2009). Foram também realizados estudos recorrendo à utilização do método *Radioimmunoprecipitation Assay* (RIPA) que demonstrou igualmente um óptima *performance*, sendo inclusivamente apontado como uma possível técnica de referência na avaliação da *performance* de outros testes. No entanto foi considerado um método muito complexo e dispendioso (Otani et al. 2009).

Recomenda-se que a comparação de desempenho entre diferentes métodos imunológicos para cada população de infectados seja realizada, dado que cada população tem características imunológicas próprias, que podem fazer com que determinado teste tenha um melhor desempenho que outros (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2001). Desta forma, variados estudos têm já sido realizados em países não-endémicos, onde as populações de imigrantes variam quanto aos locais de origem (Flores-chávez et al. 2007; Flores-Chávez et al. 2009; Assal et al. 2006; López-Chejade et al. 2005). A reactividade cruzada de alguns pacientes infectados com *Leishmania spp.*, *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) (não patogénico) e *Plasmodium spp.* está bem estabelecida, devendo este ser um factor a ter em consideração na escolha do teste serológico mais adequado para uma população (WHO Expert Committee 2002; Flores-Chávez et al. 2009).

1.3.1 Validação de Métodos Laboratoriais

É considerado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* que utilização de novos testes imunológicos qualitativos e a sua comparação com ensaios já existentes é importante para a validação de um rastreio (National Committee for Clinical Laboratory Standards 2001). Esta comparação entre imunoensaios para a Doença de Chagas já é realizada actualmente em vários países europeus, como é o caso de Espanha e de França (Flores-Chávez et al. 2009; Fondation Merieux & World Health Organization 2008).

A utilização de técnicas qualitativas relacionadas com diagnósticos de doenças infecciosas leva a que se possam obter apenas dois tipos de resultados, segundo um

valor de *cutoff*, acima do qual o teste será positivo, e abaixo do qual o teste será negativo. O *cutoff* é estabelecido pelo fabricante, baseando-se na utilização do teste, e na sensibilidade e especificidade esperadas. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo e a prevalência da doença na população determinam a utilidade de um teste: de rastreio, confirmatório ou para monitorização (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

A validação de um teste de rastreio ou de diagnóstico é normalmente realizada através da comparação dos resultados obtidos com o ensaio candidato com os resultados obtidos através de um ensaio que indique o verdadeiro diagnóstico, ou que se aproxime o mais possível do valor real (ensaio *gold standard*). No caso de não existir um método *gold standard* que forneça um diagnóstico, pode ser realizada uma comparação entre dois métodos, recorrendo a testes de concordância (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

Na realização de testes de concordância não se aplicam os termos sensibilidade nem especificidade, mas sim a percentagem de concordância positiva do método candidato (PPA) e a percentagem de concordância negativa do método candidato (NPA). A percentagem total de concordância é também normalmente calculada, embora em caso de discrepância apenas as medidas anteriores possam indicar em que gama de resultados se encontram as diferenças entre os métodos (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

A prevalência da doença em estudo tem interferência nos resultados obtidos na comparação, e difere de população para população de indivíduos. Os resultados obtidos numa comparação entre métodos são válidos apenas para a população em que esta foi efectuada (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). No caso de Portugal torna-se importante a validação de métodos para a população de migrantes latino-americanos, uma vez que ao serem provenientes de diversas regiões poderão estar infectados com diversos grupos de *T. cruzi*. É recomendado ainda que se compare o comportamento de ensaios ELISA que utilizam lisado de *Trypanosoma* e os que utilizam antígenos recombinantes na fase sólida, de forma a esclarecer se são semelhantes ou se deveria existir uma associação entre eles na realização de rastreios (World Health Organization 2007a).

Num estudo efectuado com amostras originárias do Brasil e do Panamá, verificou-se uma ausência de reactividade cruzada com *T. rangeli* quando foram utilizados os kits comerciais de ELISA da BIOS Chile, BioMérieux Brasil, Wiener e Omega (Caballero et al. 2007). Considera-se que a utilização de testes que usam antígenos recombinantes ou péptidos sintéticos leva à obtenção de resultados com maiores valores de especificidade quando comparados com testes que utilizam extratos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Caballero et al. 2007). Desta forma, verifica-se que as reacções cruzadas são mais frequentes com a utilização de testes que utilizam extrato total do parasita como antígeno (López-Chejade et al. 2005; Flores-Chávez et al. 2006).

Num estudo efectuado em França que utilizou cinco testes de ELISA diferentes (*Bioelisa Chagas*® da Biokit Espanha, *ELISA Cruzi*® da BioMérieux França, *Chagatek Elisa*® da Lemos Argentina, *T.cruzi ELISA Test System-1*® da Ortho Clinical Diagnostics USA e *EIAgen Trypanosoma cruzi Ab*® da Adaltis Itália), foi demonstrado que os testes com maiores valores de reprodutibilidade correspondem aos da Ortho Clinical Diagnostics e BioMérieux (Assal et al. 2006). Quanto à melhor combinação entre sensibilidade e especificidade destacaram-se, no mesmo estudo os testes da Biokit e BioMérieux (Assal et al. 2006). Um estudo comparativo efectuado pela Organização Mundial de Saúde em 2008 obteve valores bastante elevados tanto de sensibilidade como de especificidade nos testes de ELISA utilizados (das casas comerciais *Embrabio* (Brasil), *Ebram* (Brasil), *Laboratório Lemos* (Brasil), *Meridian Diagnostics* (EUA), *BIOSChile* (Chile), *Biolab-Mérieux* (Brasil), *Abbott Laboratories* (EUA), *IICS Univ. de Asunción* (Paraguai), *Wiener* (Argentina), *Biokit* (Espanha) e *Hemagen Diagnósticos* (EUA)), sendo por isso boas escolhas de utilização em rastreios para *T. cruzi*. Neste estudo os valores mínimos de sensibilidade verificados nos ensaios ELISA são de cerca de 89,3% e os valores mínimos de especificidade correspondem a 95,2% (Otani et al. 2009).

Recentemente têm sido também estudados testes rápidos que utilizam antígenos recombinantes em ensaios imunocromatográficos (Chappuis et al. 2010). Como vantagens estes testes possuem a possibilidade de uso individual, processamento rápido, armazenamento à temperatura ambiente, e sem necessidade de equipamentos de laboratório nem técnicos especializados (Chappuis et al. 2010). Estudos realizados em Espanha verificaram que a utilização de testes rápidos permite a detecção de mais de

92% dos infectados com *T. cruzi* (Flores-Chávez et al. 2006). Na Suíça foi efectuado recentemente um estudo no qual foram obtidos valores de sensibilidade de 95,2% a 96%, e especificidade de 99,8% a 99,9%, recorrendo à utilização do teste rápido, *Chagas Stat-Pak* (Chappuis et al. 2010).

A realização de um adequado controlo de qualidade é muito importante não só nos métodos já estabelecidos, como também nos métodos candidatos (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). Os controlos fornecidos pelo fabricante deverão ser utilizados como recomendado, devendo ser realizados diariamente (Clinical and Laboratory Standards Institute 2008). A inexistência de programas de controlo de qualidade (interno ou externo), é infelizmente um problema que se tem vindo ainda a verificar em algumas regiões do Equador, Panamá, Guatemala e Brasil (World Health Organization 2007a).

1.3.2 Realização de Diagnóstico em Áreas Não Endémicas

Em alguns países europeus são já efectuados rastreios sistemáticos para a transmissão congénita de Doença de Chagas (World Health Organization 2009b).

A realização de um rastreio em grávidas de risco considera-se de grande importância, pois estudos provam que a maioria das grávidas infectadas são assintomáticas (Nisida et al. 1999). Por isto, a realização deste tipo de rastreios é considerada rentável mesmo em áreas não-endémicas para a Doença de Chagas (Wilson et al. 2008; Sicuri et al. 2011).

Há uma crescente preocupação no que respeita ao diagnóstico da doença congénita, pelo que é recomendada para este fim a utilização de métodos que detectam o parasita, e ainda, para acompanhamento da doença, a pesquisa da persistência de anticorpos após o oitavo mês de nascimento (World Health Organization 2007; Pérez-Molina et al. 2009).

Considera-se que existe transmissão congénita quando são obtidos resultados positivos em testes de concentração para evidência do parasita quer em sangue venoso do recém-nascido quer em sangue do cordão umbilical, podendo para este efeito ser utilizada a técnica de PCR e o exame directo (Le Loup et al. 2009). No entanto, quando não existe possibilidade de acompanhar o recém-nascido imediatamente após o parto, considera-se que a detecção de transmissão congénita pode ser realizada nove meses

após o nascimento, aplicando testes serológicos no sangue da criança (Le Loup et al. 2009).

Em Janeiro de 2008 foi iniciado um programa de rastreio dirigido a grávidas de risco e recém-nascidos cujas mães se encontram infectadas nos Hospitais Universitários de Genebra, na Suíça (Jackson et al. 2009). Nesta instituição as grávidas efectuam um teste serológico de rastreio e um confirmatório, sendo que, em caso de positividade materna, é realizada PCR e exame microscópico de sangue do cordão umbilical, ou serologia ao bebé no nono mês de idade (Jackson et al. 2009). Em Itália existem actualmente dois centros que efectuam rastreios de infecção congénita para Doença de Chagas (World Health Organization 2009b). Em Espanha, actualmente este tipo de rastreio é efectuado nas comunidades autónomas de Madrid (Flores et al. 2008), Valência (Rueda et al. 2009) e Catalunha (Generalitat de Catalunya - Departament de Salut 2010). Nestas três comunidades autónomas são utilizadas na grávida testes serológicos de rastreio, sendo que na comunidade Valenciana é utilizado como rastreio um teste rápido, que quando positivo é confirmado com testes serológicos (ELISA e IFI) (Flores et al. 2008; Rueda et al. 2009; Generalitat de Catalunya - Departament de Salut 2010).

Na tabela 3 encontram-se os testes comerciais de rastreio e confirmação de infecção por *T. cruzi* disponíveis actualmente em Espanha.

Tabela 3 – Testes comerciais disponíveis em Espanha, segundo dados do *Ministerio de Sanidad y Política Social*.

Empresa	Nome do Teste
<i>Inverness Medical</i>	<i>Immunofluor Chagas (Biocientífica)</i>
<i>LabClinics</i>	<i>Biognost® IFA</i>
<i>Innogenetics Ibérica</i>	<i>IFA Kit Tripanosomiasis (MarDx)</i>
<i>Vitros</i>	<i>T. cruzi IgG ELISA (Cellabs)</i>
<i>Johnson&Johnson</i>	<i>ORTHO® T.cruzi ELISA Test System</i>
<i>Abbot Diagnostic</i>	<i>CERTEST Chagas ELISA Test</i>
<i>BLK Diagnostics</i>	<i>BLK T.cruzi IgG ELISA</i>
<i>BioMérieux España</i>	<i>Elisa cruzi (Chagas disease)</i>
<i>Izasa</i>	<i>Bioelisa Chagas Biokit</i>
<i>Diasorin / Radim Ibérica / Siemens Healthcare Diagnostics</i>	<i>NovaLisa™ Chagas (T. cruzi) IgG ELISA</i>
<i>Inverness Medical / Laboratorios Leti / CTK Biotech</i>	<i>OnSite Chagas Ab Combo Rapid Test</i>
<i>Operon SA</i>	<i>Stick Chagas</i>
<i>RAL Técnica para el Laboratorio, S.A.</i>	<i>Chagas Check-1 Gernon</i>

Considera-se que 60 a 70% dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* chegam à fase indeterminada da doença (Rassi & Marin-Neto 2010). Dado o elevado número de doentes sem sintomatologia sugestiva da patologia, torna-se muito importante a realização de um diagnóstico laboratorial e de rastreios sistemáticos em áreas não endémicas. Em Portugal não existe um rastreio sistemático em dadores de sangue nem em grávidas de risco (World Health Organization 2009b).

Dado o elevado número de infectados verificado em imigrantes latino-americanos em Espanha, é também desde 2005 considerado um factor de exclusão para doação de sangue e órgãos a serologia positiva para Doença de Chagas (Ministerio de Sanidad y Consumo 2005).

1.3.3 Meios Complementares de Diagnóstico

Os meios utilizados para avaliação do comprometimento de órgãos e evolução da Doença de Chagas são o electrocardiograma (ECG), e diversos métodos imagiológicos principalmente direccionados para a detecção de patologia cardíaca e digestiva (World Health Organization 2007; Fondation Merieux & World Health Organization 2008).

O ECG é inclusivamente o exame que de uma forma geral é solicitado numa fase inicial de avaliação do doente infectado por *T. cruzi*, uma vez que as alterações neste exame precedem normalmente o aparecimento de sintomas e de alterações na radiografia (Marques et al. 2006).

Considera-se importante que todos os pacientes diagnosticados com Doença de Chagas procedam a uma radiografia posteroanterior e lateral do tórax, de forma a verificar a existência de cardiomegália e alterações relacionadas com megaesófago (Pinazo et al. 2010; Rassi & Marin-Neto 2010).

A importância dada à avaliação radiográfica deve-se à existência de alterações no sistema digestivo em mais de 11% dos doentes assintomáticos (Pinazo et al. 2010). A observação de um diâmetro superior a 6,5 cm no cólon sigmóide ou descendente define a existência de megacólon (Pinazo et al. 2010).

Para além dos meios de avaliação da doença já referidos, um estudo brasileiro demonstrou que outros métodos poderão ser também úteis, como é o caso do ecocardiograma e electrocardiograma dinâmico de 24 horas (Marques et al. 2006).

Alguns estudos sugerem ainda que a quantificação dos níveis séricos ou plasmáticos de peptídeo natriurético tipo B (BNP), secretado pelos ventrículos e cujas concentrações plasmáticas aumentam de acordo com a severidade da insuficiência cardíaca, poderá ser útil na Doença de Chagas para determinar o grau de insuficiência cardíaca e avaliar o prognóstico do doente (Marques et al. 2006; Le Loup et al. 2009).

1.4 Tratamento na Doença de Chagas

Para o tratamento etiológico da Doença de Chagas existem em utilização dois derivados nitroimidazólicos, tripanocidas, Nifurtimox e Benznidazol (Villar et al. 2009), que foram inicialmente testados em casos de fase aguda, e mais tarde na fase crónica (World Health Organization 2007a). Nifurtimox foi lançado para o mercado em 1967 pela *Bayer*, com o nome comercial *Lampit*[®], e Benznidazol foi lançado em 1972 pela *Roche*, com os nomes comerciais *Rochagan*[®] e *Radanil*[®] (Pérez-Molina et al. 2009).

A actividade antiparasitária dos dois fármacos relaciona-se com a sua toxicidade no próprio hospedeiro (World Health Organization 2007a).

Nifurtimox actua sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do parasita, formando radicais que levam a produtos com acção tóxica para *T. cruzi* (Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED 2007.; World Health Organization 2007). É administrado por via oral, e eficaz sobretudo na fase aguda da doença, levando ao desaparecimento da parasitémia em mais de 80% dos indivíduos tratados. Tal como Nifurtimox, Benznidazol tem a capacidade de formar radicais livres intracelulares (Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED 2007). Este fármaco, também administrado por via oral e absorvido no trato intestinal, promove uma modificação covalente de macromoléculas por intermediários de nitro-redução (World Health Organization 2007; Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED 2007). Na tabela 4 encontram-se a posologia recomendada para cada um dos antiparasitários em adultos e os seus efeitos adversos mais comuns.

Tabela 4 – Posologia em adultos e efeitos adversos de Nifurtimox e Benznidazol segundo a publicação de 2009 do *WHO Model Formulary* (World Health Organization 2009c)

Fármaco	Posologia	Efeitos Adversos
Nifurtimox	8 a 10 mg/kg/dia, divididos em três tomas diárias, durante 90 dias	Reacções de hipersensibilidade tais como dermatite, icterícia, anafilaxia e complicações relacionadas com o trato gastrointestinal e sistema nervoso
Benznidazol	5 a 7 mg/kg/dia, divididos em duas tomas diárias, durante 60 dias	Manifestações cutâneas tais como prurido generalizado, urticária, exantema, edema, anorexia e distúrbios gastrointestinais

Está provado que ambos os fármacos são eficazes na fase aguda da patologia, mas a sua eficácia diminui à medida que a doença se torna crónica. No entanto, sabe-se que podem eventualmente diminuir a carga parasitária na fase crónica e indeterminada da doença, de forma a prevenir complicações (Villar et al. 2009). O efeito benéfico de

Benznidazol durante a fase crónica da doença foi já comprovado (Pérez-Molina et al. 2009), embora a tolerância ao tratamento em geral não seja a mais desejável, evidenciando-se efeitos secundários em cerca de 30% dos doentes tratados e uma taxa de *drop-out* de 10% a 16% (Pérez-Molina et al. 2009; World Health Organization 2007). Estudos realizados na Argentina demonstraram que a utilização de Benznidazol reduz a progressão da patologia e promove a seroconversão a longo termo em doentes sem comprometimento cardíaco (Viotti et al. 2011). Sabe-se actualmente que os efeitos secundários de ambos os fármacos tripanocidas são mais frequentes e graves em indivíduos adultos (World Health Organization 2007a).

Apesar de tudo Benznidazol tem uma menor incidência de efeitos secundários em relação a Nifurtimox, e é por isso recomendado como a primeira escolha para o tratamento (Pinazo et al. 2010). Benznidazol é também o fármaco mais indicado para administração em crianças (World Health Organization 2010), tendo sido verificado que crianças abaixo dos 12 anos demonstram uma boa tolerância ao fármaco (Fondation Merieux & World Health Organization 2008).

Dadas as incertezas sobre a razão risco-benefício, muitos clínicos, em caso de forma cardíaca ou digestiva, prescrevem apenas tratamento de suporte, numa tentativa de evitar uma agravação do problema no órgão, ou recomendam apenas modificações no estilo de vida e dieta (World Health Organization 2007a). Para evitar a progressão da cardiopatia são utilizados inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores de receptores beta adrenérgicos, espironolactona, digitálicos, diuréticos e amiodarona (World Health Organization 2007a).

Benznidazol está disponível aos clínicos em Portugal, Espanha e França através dos ministérios da saúde ou em alguns casos através de farmácias hospitalares, embora nenhum dos fármacos disponíveis para a Doença de Chagas esteja registado em países não endémicos (Gascon et al. 2009; World Health Organization 2009b).

Está contra-indicada a administração de qualquer um destes fármacos a grávidas ou doentes com insuficiência renal ou hepática (Bern et al. 2007). Assim, é recomendada a detecção atempada e tratamento adequado das infecções congénitas (World Health Organization 2009b).

Encontra-se actualmente em curso um projecto de avaliação da interrupção da Tripanosomíase Americana com Benznidazol, “*The Benznidazole Evaluation For*

Interrupting Trypanosomiasis project” (*BENEFIT*), o primeiro estudo randomizado e controlado multicêntrico contra placebo efectuado em doentes que se encontram na fase crónica da doença, na sua forma cardíaca (Marin-Neto et al. 2009). Este projecto foi iniciado em Novembro de 2004, tendo sido recrutados actualmente mais de 1600 pacientes de 42 instituições de saúde da Argentina, Bolívia, Brasil e Colômbia (Marin-Neto et al. 2009). Com o objectivo principal de avaliar a segurança, tolerância, redução de mortalidade e danos cardiovasculares inerentes a este fármaco na população estudada, foi até agora verificado que cerca de 15% dos pacientes interrompem a terapêutica, embora cerca de 6% desses doentes a retomem posteriormente (Marin-Neto et al. 2009).

Estima-se que a cura parasitológica em doentes em fase aguda tratados com Benznidazol ou Nifurtimox seja entre 60% a 85% dos casos (Bern et al. 2007). Em caso de crianças infectadas por transmissão congénita e tratadas durante o primeiro ano de vida esta estimativa sobe para os 90% (Bern et al. 2007).

A *American Medical Association* recomenda o tratamento da Doença de Chagas com um dos fármacos tripanocidas disponíveis no mercado em casos específicos, como se encontra descrito na ilustração 4.

Recomenda-se tratamento antiparasitário	Deverá ser oferecido tratamento antiparasitário	Considera-se opcional o tratamento antiparasitário
<ul style="list-style-type: none"> • Infecção aguda; • Infecção congénita; • Reactivação; • Infecção crónica em doentes até aos 18 anos de idade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos com idade compreendida entre os 19 e 50 anos sem cardiomiopatia chagásica avançada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Adultos com idade superior a 50 anos.

Ilustração 4 – Recomendações da *American Medical Association* para o tratamento antiparasitário de Doença de Chagas, segundo o autor Bern em 2007.

O tratamento deverá ser realizado ponderando os seus benefícios e riscos, os custos, a aceitação ou recusa do doente e a avaliação clínica do médico (World Health Organization 2007a).

Não existe actualmente uma vacina disponível que previna a Doença de Chagas (World Health Organization 2011). Encontram-se em estudo as respostas imunes que podem controlar a infecção causada *Trypanosoma cruzi*, e quais as moléculas-alvo que possam ser utilizadas como vacina, embora ao tratar-se de uma doença que evolui silenciosamente, a investigação nesta área não seja facilitada (Stuart et al. 2008). As pesquisas mais actuais começam a interessar-se pela imunização em reservatórios animais e pela vacinação terapêutica de indivíduos na fase crónica da doença (Stuart et al. 2008).

Segundo dados de 2007 publicados pela Organização Mundial de Saúde, os avanços de investigação no que respeita a novos fármacos para a Doença de Chagas debruçam-se maioritariamente sobre:

- Inibidores da síntese de ergosterol, necessário à proliferação parasitária;
- Inibidores da protease de cistina (cruzipaína), responsável pela actividade proteolítica em todo o ciclo de vida do parasita (proliferação, crescimento e diferenciação do parasita);
- Inibidores do metabolismo do pirofosfato, relacionado com a resposta a condições adversas de sobrevivência (stress ambiental), regulação osmótica e utilização de energia;
- Inibidores da síntese e metabolismo da tripanotona;
- Inibidores da aquisição de purinas do hospedeiro, impedindo a síntese de RNA e proteínas.

Encontra-se actualmente em desenvolvimento um estudo em fase II de um candidato ao tratamento de Doença de Chagas, denominado E1224, derivado do fármaco pro-ravuconazol, um anti-fúngico inibidor de ergosterol. Esta opção de tratamento está a ser testada em doentes adultos em fase crónica indeterminada (Torrico 2011).

1.4.1 Tratamento Pediátrico

A eficácia do tratamento antiparasitário em crianças com menos de 3 anos de idade é de cerca de 100%, principalmente quando efectuado com Benznidazol (Gascón & Pinazo 2008; González-Tomé et al. 2008), sendo que esta percentagem baixa para cerca de 62% a 56% em idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos (González-Tomé et al. 2008).

Embora ambos os fármacos quando administrados em crianças demonstrem uma boa tolerância aos efeitos adversos, não existem ainda formulações disponíveis no mercado para uso pediátrico (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). Assim, para o tratamento em crianças, é realizado o fraccionamento do comprimido, o que pode levar à administração de dosagens incorrectas (Fondation Merieux & World Health Organization 2008). Na tabela 5 encontra-se a posologia recomendada para Benznidazol e Nifurtimox em crianças.

Tabela 5 - Posologia recomendada para o tratamento pediátrico com Benznidazol e Nifurtimox, segundo o autor González-Tomé e a *Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED*.

Fármaco	Posologia	
Nifurtimox	1 a 10 anos	10 a 15 mg/kg/dia em 3 a 4 tomas, durante 90 dias.
	11 a 16 anos	14,5 a 15 mg/kg/dia em 4 tomas, durante 75 dias
Benznidazol	5 a 10 mg/kg/dia, dividido em 2 tomas durante 30 a 60 dias (preferivelmente 7,5 mg/kg/dia em 2 tomas durante 60 dias ou 10 mg/kg/dia durante 30 dias)	

A organização *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi) em colaboração com o Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) desenvolveu recentemente uma formulação pediátrica de benznidazol, para um correcto tratamento de crianças

infectadas por *T. cruzi*, embora ainda não comercializada, cujo registo foi efectuado a 12 de Dezembro de 2011 (Drugs for Neglected Diseases initiative 2011).

1.4.2 Avaliação Pós Terapêutica da Doença de Chagas

Os métodos mais utilizados na avaliação pós terapêutica da Doença de Chagas são os ensaios ELISA, IFI e HAI, pois têm vindo a demonstrar reduzidas taxas de falsos positivos e falsos negativos (Pérez-Molina et al. 2009).

A seroconversão após tratamento é muito lenta, sendo que os anticorpos poderão levar cerca de uma década a diminuir substancialmente em indivíduos curados (World Health Organization 2007a). Assim, é sugerido que a avaliação da terapêutica seja efectuada através da comparação do título de anticorpos, cuja diminuição é sugestiva de um processo de cura. Foi ainda provado que este método é também um bom indicador de falha terapêutica (Pérez-Molina et al. 2009).

Após a realização de uma terapêutica bem sucedida para a Doença de Chagas, o perigo de reinfeção continua a existir, mesmo em áreas não endémicas, onde deverão existir políticas de vigilância adequadas em relação a transfusões sanguíneas ou transplantes de órgãos (World Health Organization 2007a).

1.5 Imigração Latino-americana na Europa

Estima-se que cerca de 3% da população mundial viva actualmente fora do seu país de origem, sendo a Europa considerada a região de passagem ou destino da maioria dos migrantes em todo o mundo, seguindo-se-lhe o continente asiático, a América do Norte e a África (Department of Economic and Social Affairs in the United Nations Secretariat 2009).

Dados mostram que a migração de latino-americanos tem vindo a tornar-se cada vez mais evidente nos países da Europa do Sul, nomeadamente em Espanha, Itália e Portugal, sendo que a maioria dos migrantes são provenientes da América do Sul (Góis et al. 2009).

A migração para a Europa tem sido resultado de desafios económicos que se foram verificando nos países da América latina. Este movimento teve início no século XIX com as migrações coloniais e pós coloniais (portugueses e espanhóis que

regressavam das colónias já independentes), que duraram até ao início do século XX, e posteriormente verificou-se também entre 1960 e 1980 a migração de refugiados políticos e outros migrantes qualificados interessados em encontrar novos empregos nos países de destino. A migração actual deve-se ao desemprego e a instabilidade política nos países de origem, e ao facto dos países de destino pertencerem à União Europeia que demonstrou um crescimento económico desde os anos 80 (Padilla & Peixoto 2007).

Os migrantes latino-americanos para a Europa são maioritariamente jovens, em idade reprodutiva e com as mulheres em elevada proporção (International Organization for Migration 2004).

A oferta de emprego nos países de destino no que respeita a funções normalmente desempenhadas por mulheres, como prestação de serviços a idosos e serviços de limpeza quer domésticos quer industriais leva a que a população migrante seja maioritariamente feminina (Padilla & Peixoto 2007). Existe na Europa um elevado número de mulheres brasileiras envolvidas em prostituição e tráfico de mulheres e raparigas (International Organization for Migration 2004).

1.5.1 Imigração em Portugal

Em Portugal, desde o início do século XX até à década de 70, a emigração foi o movimento migratório que mais se destacou, especialmente para o Brasil numa fase inicial, e posteriormente para outros países da Europa, com especial destaque para a França (Serviço de Estrangeiros e Fronteiras 2009; Pimentel 2006). A partir de 1974 em Portugal passa a destacar-se principalmente a entrada de imigrantes, devido à instalação de condições sociais, políticas e económicas mais favoráveis (Fonseca et al. 2009). Estes são principalmente provenientes dos países africanos de língua oficial portuguesa (PALOP), de Leste, e do Brasil (Fonseca et al. 2009). Foi na década de 80 que se verificou que a afluência de brasileiros na esperança de encontrarem melhores condições económicas em Portugal era cada vez maior, possivelmente devido à entrada do nosso país para a União Europeia em 1986, (Pires 2010; International Organization for Migration 2004).

A nacionalidade estrangeira mais representativa em Portugal, no ano de 2010, é a brasileira (119 363 indivíduos no total, 66 885 mulheres e 52 478 homens), representando 26,81% de toda a comunidade estrangeira residente em Portugal (Serviço

de Estrangeiros e Fronteiras 2010). Segundo dados de 2010 do Serviço de Estrangeiros e Fronteiras, os maiores números relativos à população estrangeira residente em território nacional encontram-se nos distritos de Lisboa, Faro, Setúbal e Porto, com 187 578, 71 808, 47 694, e 27 028 cidadãos estrangeiros, respectivamente.

De acordo com dados do Serviço de Estrangeiros e Fronteiras, excluindo o Brasil, no ano de 2010, os países mais representativos de imigrantes legais latino-americanos em Portugal são a Venezuela (2 009), Cuba (816), Colômbia (586), Argentina (494), e Equador (419) (Serviço de Estrangeiros e Fronteiras 2010). Relativamente aos imigrantes brasileiros ilegais em Portugal, foram identificados 15,9% do total de imigrantes (Serviço de Estrangeiros e Fronteiras 2010). No ano de 2009, entre os locais de residência de cidadãos brasileiros em situação legal em Portugal destacaram-se as regiões de Lisboa (com 23 501 homens e 29 623 mulheres), Setúbal (com 6 566 homens e 7 440 mulheres), Faro (com 5 950 homens e 6 617 mulheres), e Porto (com 3 704 homens e 5 336 mulheres) (Serviço de Estrangeiros e Fronteiras 2009). A grande maioria dos imigrantes brasileiros em Portugal são trabalhadores pouco qualificados originários de zonas rurais ou pequenas localidades do Brasil, sendo provenientes maioritariamente dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahía, Paraná, Espírito Santo, Goiás e Pernambuco (Bógus 2007). A facilidade da entrada de imigrantes em Portugal e a aquisição de nacionalidade que se tem vindo a verificar, será devida à existência de possíveis descendências de cidadãos portugueses (Padilla & Ortiz 2009).

A percentagem mais representativa de nados vivos filhos de mães com nacionalidade estrangeira em Portugal, segundo dados do Instituto Nacional de Estatística, corresponde à nacionalidade brasileira com um total de 3 786 recém-nascidos representando 3,81% dos nascimentos em Portugal de filhos de mães estrangeiras em 2009, valor este que tem vindo a aumentar bastante nos últimos anos (Instituto Nacional de Estatística 2010).

Devido à instabilidade económica brasileira na altura, até meados dos anos 90 os imigrantes brasileiros em Portugal pertenciam a uma classe média qualificada (Góis et al. 2009). Após os anos 90 e até hoje, os imigrantes brasileiros em Portugal são essencialmente indivíduos pouco qualificados e mais associados ao comércio português (Góis et al. 2009). Apesar da possível existência de algumas dificuldades de inserção

laboral, estudos demonstram que os imigrantes latino-americanos conseguem na sua maioria exercer a sua profissão (Padilla & Ortiz 2009).

Portugal tem vários acordos com o Brasil garantindo direitos políticos a brasileiros em Portugal, e lançou um programa de regularização para imigrantes ilegais brasileiros em 2003 (Padilla & Peixoto 2007). Este acordo, denominado por “Acordo Lula”, permite regularizar a situação de todos os estrangeiros que tenham entrado em Portugal até 2003 e que tenham contrato de trabalho e efectuado descontos para a repartição de Finanças e Segurança Social (Ministério dos Negócios Estrangeiros 2003).

As migrações ocorrem principalmente na fase de jovem adulto, fase esta propícia ao casamento e à constituição de família. As imigrantes brasileiras em Portugal pertencem na sua maioria a uma faixa etária entre os 25 e os 34 anos, sendo na sua maioria solteiras ou divorciadas (Raposo & Togni 2009). O casamento é frequentemente pensado como uma opção económica razoável e de mobilidade social para a vida adulta de uma mulher (Raposo & Togni 2009). No ano de 2006, um em cada doze cidadãos portugueses contraíram matrimónio com um estrangeiro ou estrangeira, sendo que as imigrantes que em Portugal se unem matrimonialmente com cidadãos portugueses são essencialmente brasileiras (Raposo & Togni 2009).

Actualmente o regime legal de atribuição de nacionalidade portuguesa encontra-se bastante alargado, reconhecendo o estatuto de cidadania aos indivíduos que demonstrem fortes laços com Portugal (Serviço de Estrangeiros e Fronteiras 2010). Como reforço no combate à imigração ilegal foi em 4 de Julho de 2007 decretada a “Lei de Estrangeiros”, que apresenta medidas punitivas para os indivíduos imigrantes que contraem casamento com o objectivo de aquisição de nacionalidade (Raposo & Togni 2009).

Durante a gravidez, sabe-se actualmente que o início da vigilância é mais tardio nas mulheres imigrantes, em comparação com as mulheres portuguesas (Dias et al. 2009). Em 2001 foi publicado em Diário da República o Despacho nº 25.360/2001, no qual é referido que o acesso ao Sistema Nacional de Saúde é facultado da mesma forma tanto a cidadãos estrangeiros a residir legalmente em Portugal como a cidadãos portugueses (Ministério da Saúde 2001). Quanto aos cidadãos estrangeiros em situação irregular ou indocumentados, o acesso ao Sistema Nacional de Saúde é facultado de igual forma mediante a apresentação de um documento comprovativo da sua residência em Portugal há mais de noventa dias (Ministério da Saúde 2001). De forma a identificar

os problemas que os imigrantes possam ter no acesso aos cuidados de saúde em Portugal, foi criado em 2003 o Gabinete de Saúde do Centro Nacional de Apoio ao Imigrante, cuja função se centra essencialmente no fornecimento de informação ao imigrante sobre os seus direitos e deveres, na articulação com entidades promotoras de saúde, e no acompanhamento de indivíduos em situações de carência (Dias et al. 2009). Esta entidade encontra-se acessível a todos os indivíduos imigrantes, quer em situação legal ou ilegal (Dias et al. 2009).

1.5.2 A Doença de Chagas na Europa

Países com indivíduos provenientes de zona endémica para Doença de Chagas têm risco de transmissão autóctone por transfusão, transplante, e transmissão materno-fetal (Velarde-Rodríguez et al. 2009). Estima-se que o número de casos de infecção por *T. cruzi* na Europa exceda os 80 000 (World Health Organization 2009b), tendo sido publicado o primeiro caso de Doença de Chagas na Europa em 1981 (Albajar-Vinas & Jannin 2011).

O número estimado de infectados em zonas onde não existe transmissão vectorial e onde já foram diagnosticados casos de Doença de Chagas encontra-se na tabela 6.

Tabela 6 – Estimativa de infectados em área não endémica, segundo os autores Schmunis e Yadon e a Organização Mundial de Saúde.

País	Estimativa de infectados
Alemanha	935
Austrália	1 067
Áustria	140 a 180
Bélgica	1 982
Canadá	1 218
Croácia	Sem estimativas
Dinamarca	Sem estimativas
Espanha	39 985 a 65 258
Estados Unidos	56 028 a 357 205
França	2 166
Holanda	480
Itália	5 520 a 7 081
Japão	1 510
Portugal	850
Reino Unido	14 000
Roménia	Sem estimativas
Suécia	1 118
Suíça	3 000

Os principais desafios no que respeita ao controlo da Doença de Chagas em países não endémicos são (1) a detecção da doença na fase assintomática, (2) a realização de um diagnóstico serológico apropriado por profissionais de saúde devidamente instruídos, (3) o conhecimento geral sobre a emergência da doença, (4) o acesso a tratamento e *follow-up*, (5) a prevenção da transmissão por transfusão e transplante, (6) a detecção atempada de casos congénitos, (7) a existência de bases de dados epidemiológicas, (8) o conhecimento do contexto socio-cultural e económico dos migrantes, (9) o conhecimento da existência de tratamento, (10) o estabelecimento de relações de confiança entre autoridades de saúde e comunidades imigrantes (legais ou ilegais), e (11) a implementação de estratégias adequadas para o manuseamento dos doentes chagásicos. Todas estas questões são ultrapassáveis com a interacção entre diferentes profissionais de saúde em conjunto com uma aproximação às comunidades

levando a um maior envolvimento dos próprios pacientes nos seus cuidados (Velarde-Rodríguez et al. 2009).

Em países não endémicos têm sido detectados alguns casos de Doença de Chagas em fase aguda, nomeadamente em viajantes europeus (World Health Organization 2009b). No entanto, nesses países não são geralmente detectados casos de Doença de Chagas em fase aguda em grávidas (Pérez-López & Chedraui 2010).

Estima-se que em toda a América Latina ocorram cerca de 14 385 casos de transmissão congénita de Doença de Chagas, por ano (Organización Panamericana de la Salud 2006). Na Europa foram já reportados casos em Espanha (Flores-Chávez et al. 2008; Muñoz et al. 2007; Muñoz et al. 2009), na Suíça (Jackson et al. 2009), Roménia e Suécia (World Health Organization 2009b). No entanto, na maioria dos países europeus não existe um rastreio sistemático de detecção de transmissão congénita de Doença de Chagas (World Health Organization 2009b).

Estima-se que na Europa existam 1 680 a 8 284 casos de Cardiopatia Crónica Chagásica (Guerri-Guttenberg et al. 2008).

A descoberta da existência de um elevado número de casos assintomáticos levou a que se considere muito importante a realização de rastreios serológicos nas populações de risco (Negrette et al. 2005), incluindo em áreas não endémicas, nas quais se verifica que a maioria dos infectados são assintomáticos (Muñoz et al. 2006; Muñoz et al. 2009; Gascon et al. 2009; Arandes et al. 2009). É considerado que a maioria das mulheres grávidas infectadas residentes em regiões não endémicas se encontram na fase indeterminada da doença (Jackson et al. 2009), e estima-se que até 10% desta população possa transmitir a doença ao recém nascido (Negrette et al. 2005).

Um dos objectivos actualmente estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde no que respeita à Doença de Chagas consiste na obtenção de dados epidemiológicos em países não-endémicos, nomeadamente europeus, para controlo e prevenção da patologia (World Health Organization 2009b).

1.5.3 Doença de Chagas em Portugal

Em Portugal o número de residentes com Doença de Chagas até à actualidade corresponde apenas a estimativas, das quais se esperam cerca de 500 a 1000 indivíduos infectados em território nacional (Rassi & Marin-Neto 2010; Guerri-Guttenberg et al.

2008). Estes valores foram calculados de acordo com a prevalência da Doença de Chagas nos países de origem da maioria dos migrantes latino-americanos para cada país europeus, no caso de Portugal o Brasil e a Venezuela (Rassi & Marin-Neto 2010; Guerri-Guttenberg et al. 2008).

Entre os países europeus com as maiores estimativas de infectados com Doença de Chagas, Portugal é o país com a maior percentagem de migrantes originários de área endémica (Basile et al. 2011). Por isso, Portugal é também um dos países em que a percentagem de casos esperados não diagnosticados é maior, ultrapassando os 99% (Basile et al. 2011).

O número total de casos de Doença de Chagas laboratorialmente confirmados em Portugal é 8 (Amorim et al. 2008).

Para o ano de 2009, estimou-se que cerca 41 mulheres grávidas em Portugal estariam infectadas por *T. cruzi* (World Health Organization 2009b). No entanto, ao contrário de outros países europeus, não existe em Portugal um sistema de detecção sistemática de casos congénitos da Doença de Chagas, nem são efectuadas questões específicas ou rastreio sistemático para a Doença de Chagas em dadores de sangue (World Health Organization 2009b).

1.6 Justificação e Objectivos do Estudo

1.6.1 Justificação do Estudo

A Doença de Chagas é uma patologia emergente na Europa, e a sua situação epidemiológica em Portugal é desconhecida. Assiste-se a um aumento do número de imigrantes provenientes de área endémica em Portugal. A maioria dos doentes chagásicos encontra-se na fase indeterminada (sem sintomas), tornando-se obrigatório para o seu diagnóstico a realização de um teste de rastreio. Será seleccionada uma população de risco (grávidas), na qual foi provado que a realização deste tipo de rastreios é economicamente rentável. Os resultados desta investigação servirão como indicador da prevalência da doença em toda a população de latino-americanos residentes em Portugal, e como indicador da necessidade da aplicação de medidas de saúde adequadas (controlo, diagnóstico e assistência médica).

1.6.2 Objectivos do Estudo

O objectivo geral deste estudo consta em avaliar a existência de um problema de saúde pública na população imigrante de latino-americanos a residir em Portugal no que respeita à Doença de Chagas. Como objectivos específicos são considerados os seguintes:

- Avaliar a prevalência de Doença de Chagas entre a população de grávidas latino-americanas imigrantes em Portugal;
- Avaliar a necessidade da existência de programas de rastreio sistemático para essa população;
- Estabelecer as bases para um estudo de prevalência da Doença de Chagas em toda a população imigrante latino-americana prioritariamente em serviços de transfusão sanguínea, transplantação, cardiologia, gastroenterologia e clínica geral;
- Permitir o acompanhamento e eventual tratamento de recém-nascidos em risco de infecção;
- Permitir a identificação de mulheres chagásicas de forma a prevenir a transmissão vertical em gravidezes futuras;
- Alertar os profissionais de saúde para Doença de Chagas de forma a permitir o seu correcto diagnóstico;
- Avaliar a utilização e resultados obtidos com diferentes testes serológicos para a Doença de Chagas na população imigrante latino-americana em Portugal.

2 Materiais e Métodos

2.1 Desenho do Estudo

A presente investigação consiste um estudo piloto descritivo de prevalência, observacional, transversal prospectivo.

Em cada instituição hospitalar participante foi realizado um questionário para obtenção de dados epidemiológicos de cada grávida, e uma colheita de sangue para diagnóstico serológico de Doença de Chagas. No Instituto de Higiene e Medicina Tropical as amostras foram testadas e foi realizado o tratamento de dados.

2.2 Materiais

- Formulários para inquérito e consentimento informado;
- Tubos para alíquota de soro ou plasma;
- 1 a 2 mL de soro ou plasma colhido em EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) ou heparina de lítio de cada participante, obtido por punção venosa, após centrifugação;
- *Kits* de Reagente para teste de rastreio: Testes ELISA
 - *Gold ELISA Chagas*
 - Casa comercial: *REM Indústria e Comércio LTDA.*
 - Número de testes: 480
 - Lote: CHA064B
 - Proveniência: Brasil
 - Referência: Reg. ANVISA/MS 10162410454
 - Tipo de antígenos: Lisado de epimastigotas enriquecido com antígeno recombinante
 - *ORTHO® T. cruzi ELISA Test System*
 - Casa comercial: *Ortho Clinical Diagnostics, Inc.*
 - Número de testes: 480
 - Lote: CRU203
 - Proveniência: EUA
 - Referência: 6901968

- Tipo de antígenos: Lisado de células contendo antígenos recombinantes
- *Kit* de reagente para teste confirmatório: Teste IFI;
- Espectrofotómetro
 - Modelo: 680 *Microplate Reader*
 - Casa Comercial: *BIO-RAD Laboratories Ltd.*
 - Proveniência: EUA
- Micropipetas;
- Estufa *Haearus*.

2.3 Metodologia de Estudo

2.3.1 Selecção dos Hospitais Participantes

Para iniciar o estudo piloto sobre a prevalência da Doença de Chagas em grávidas latino-americanas em Portugal foram seleccionadas seis instituições hospitalares. Esta escolha foi baseada na distribuição dos migrantes legais em Portugal por distrito, pela existência de maternidade nessas instituições e ainda pelo elevado número de utentes que servem. Desta forma, foram seleccionados para o estudo o Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca (Amadora-Sintra), Hospital de São Francisco Xavier (HSFX) pertencente ao Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Hospital de Santa Maria, (do Centro Hospitalar Lisboa Norte), Hospital Dona Estefânia (HDE) do Centro Hospitalar Lisboa Central, Maternidade Dr. Alfredo da Costa (MAC), Hospital Garcia de Orta e Hospital de Faro.

2.3.2 Escolha dos Testes Serológicos

Para a avaliação da prevalência da Doença de Chagas na amostra em estudo foram utilizadas duas metodologias, como preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Foram realizados ensaios ELISA como técnica de rastreio em todas as participantes dado os elevados valores de sensibilidade associados à sua utilização, e foi seleccionada como técnica de confirmação a IFI, por apresentar bons resultados no que respeita não só a sensibilidade mas também à especificidade da técnica.

Devido à grande oferta que existe actualmente a nível mundial foram contactadas empresas internacionais que comercializam testes para rastreio e diagnóstico da infecção por *T. cruzi*. Desta forma, através de comparação entre reagentes das empresas que responderam aos contactos, foi seleccionado o ensaio ELISA da *Ortho Clinical Diagnostics*, pelos elevados valores demonstrados de sensibilidade e especificidade. Embora tenha sido efectuada também uma comparação entre os custos de cada *kit* de reagentes, a *Ortho Clinical Diagnostics* demonstrou interesse em disponibilizar o seu teste sem qualquer custo para este estudo piloto. De forma a poder realizar uma comparação entre métodos no que respeita à técnica ELISA na população latino-americana em Portugal foi também utilizado o ensaio da empresa *REM*, que apresenta também elevados valores de sensibilidade e especificidade, e que disponibilizou igualmente os seus reagentes. A empresa *REM*, que não comercializa ainda o seu *kit* em Portugal, forneceu-o gratuitamente de forma a poder ser validado para a população de risco existente no nosso país, de acordo com as normas internacionais de validação de ensaios. Quanto à escolha de um ensaio de IFI, para além de não terem sido obtidas muitas informações por parte das casas comerciais, dada a existência de uma técnica de IFI já implementada no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, na Unidade de Parasitologia Médica nos laboratórios da área de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, foi decidido que se recorreria a ela em caso de positividade nos testes de rastreio.

Na tabela 7 encontram-se resumidas as respostas por parte das casas comerciais contactadas durante a escolha dos *kits* de reagente a utilizar no estudo.

Tabela 7 – Informações cedidas pelas casas comerciais contactadas.

CASA COMERCIAL	TESTE	ANTIGÊNIO	ESPECIFICIDADE	SENSIBILIDADE	NÚMERO DE TESTES	PREÇO
REM	ELISA	Lisado de epimastigotas enriquecido com antígeno recombinante	99,70%	100%	480	600 €
Ortho Clinical Diagnostics		Lisado de células contendo antígenos recombinantes	100%	100%	480	2400 €
Izasa/Biokit		Antígeno recombinante sintético	98,6%-100%	99,3%-100%	480	Não informaram
BLK		Antígenos de estirpes existentes no Sul dos E.U.A., Argentina, Brasil, Panamá e Chile	100%	96%	96	250 €
		Antígenos recombinantes	98%-100%	100%	96	350 €
BioRad/Vircell Labclinics/Bios	IFI	Informação confidencial	99%	Sem informação	60	636,54 €
MarDx/TrinityBiotech		Epimastigotas estirpe <i>Corpus cristi</i>	Não responderam	Não responderam	48	220 €
Abbott	Comercializam reagente de Quimioluminescência para equipamento Architect					
Innogenetics/Quilaban	Não comercializam ELISA nem IFI					
RAL						
Siemens						
Biomérieux CTKBiotech	Só comercializam teste rápido e apenas em Espanha					
Certest						
Radim	Não responderam					
Wiener						
Inverness						
Wama Diagnostica						

2.3.3 População em Estudo

A todas as grávidas que compareceram na consulta pré-natal foi solicitado que respondessem ao Grupo I de um questionário simples. A amostra foi constituída por todas as grávidas que respondam afirmativamente a pelo menos uma das perguntas, relativas a estadia na América Latina, ascendência Latino-americana e histórico de transfusão e/ou transplante em área endémica. A estas foi pedido que participassem no estudo e que lessem e assinassem o consentimento informado. As grávidas que responderam negativamente a todas as perguntas do Grupo I foram excluídas do estudo. O questionário Grupo I encontra-se no Anexo 1.

2.3.4 Consentimento Informado

A cada uma das participantes foi cedido um documento de consentimento informado, o qual a participante teve que compreender e assinar para fazer parte da amostra. No mesmo documento constou informação clara e simples sobre os procedimentos e os objectivos do estudo, assim como vantagens e desvantagens que pudessem existir para a participante e seu filho. O consentimento informado encontra-se no Anexo 2.

2.3.5 Realização de Questionário para Participantes Incluídas

A cada uma das participantes incluídas no estudo foi pedido pelo profissional de saúde autorizado (médico ou enfermeiro), no decorrer da consulta, que respondesse ao Grupo II do questionário. Este teve como objectivo obter dados sobre o histórico pessoal e familiar relativo à Doença de Chagas e sobre a sua gravidez e gravidezes futuras. O questionário Grupo II encontra-se no Anexo 3.

2.3.6 Colheita de Amostras

Uma amostra de soro (tubo sem anticoagulante) ou plasma colhido em EDTA ou heparina de lítio de cada uma das participantes foi obtida por punção venosa. A colheita de amostras foi realizada pela instituição em que a participante realizou a colheita para diagnóstico pré-natal. Foi utilizada para o estudo uma pequena alíquota obtida após centrifugação da amostra na instituição em que foi obtida (1 a 2 mL de soro ou plasma) proveniente dessa mesma colheita, não tendo sido necessária a realização de uma punção adicional.

2.3.7 Armazenamento das Amostras

O armazenamento da alíquota pretendida para o estudo foi realizado provisoriamente pelo técnico de saúde que procedeu à recolha da mesma, em tubo fechado, com identificação igual à constante no questionário correspondente, a cerca de -20°C (correspondente aos congeladores existentes nos serviços de patologia clínica).

2.3.8 Transporte das Amostras

O transporte das amostras foi realizado em contentores refrigerados até ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical sempre que existiam 10 amostras armazenadas na instituição em que foram obtidas, e foi realizado por um dos responsáveis pelo estudo.

2.3.9 Realização do Teste de Rastreio

As técnicas utilizadas para o teste de rastreio foram realizadas nas instalações do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, na Unidade de Ensino e Investigação em Clínica das Doenças Tropicais. Foram realizados dois testes ELISA como rastreio para Doença de Chagas: *ORTHO® T. cruzi ELISA Test System*, e *Gold ELISA Chagas (REM)*. A leitura das densidades ópticas (DO) obtidas em cada ensaio foi efectuada através de um leitor de microplacas *Bio-Rad* modelo 680 sendo os resultados exportados automaticamente para o *software Microsoft® Office Excel 2007*. Os procedimentos resumidos de ambos os ensaios de rastreio encontram-se nos Anexos 4 (procedimento da *REM*) e 5 (procedimento da *Ortho Clinical Diagnostics*).

2.3.10 Realização do Teste de Confirmação

O teste de diagnóstico seleccionado como confirmatório para Doença de Chagas por IFI foi o implementado nas instalações do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, na Unidade de Parasitologia Médica, nos laboratórios da área de Protozoários Oportunistas, HIV e Outras Protozooses, para utilização apenas nas amostras cujo resultado do teste de rastreio se revelasse positivo. Foi colocada ainda a possibilidade de realização de PCR e exame parasitológico directo ao sangue do cordão umbilical para confirmação de infecção em recém-nascidos, na área de Protozoários Oportunistas, HIV e outras Protozooses, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Foi também referida

a hipótese de proceder ao processamento de amostras de sangue dos mesmos recém-nascidos se necessário.

2.3.11 Acompanhamento Médico

Foi acordado que cada teste positivo confirmado fosse relatado assim que disponível à instituição e ao clínico responsável pela saúde da participante em causa, para que fosse possível um acompanhamento e eventual tratamento, e determinar a possibilidade de transmissão vertical de forma a poder eventualmente tratar o neonato. Ficou estabelecido que o acompanhamento dos doentes seria feito em conjunto com a instituição hospitalar.

A metodologia de estudo encontra-se resumida na ilustração 5.

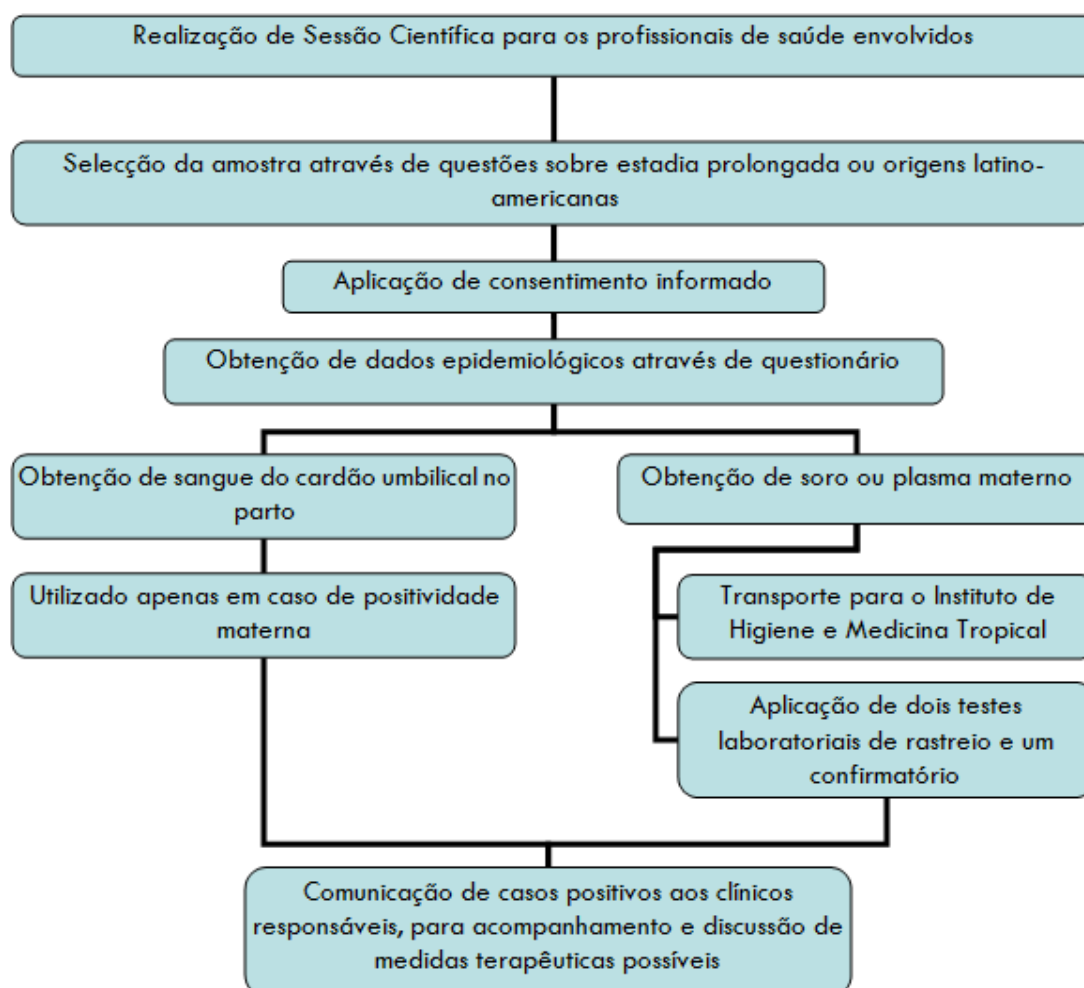


Ilustração 5 – Metodologia de estudo.

2.3.12 Implementação do Estudo

Das seis instituições hospitalares seleccionadas, em apenas três foi possível implementar o estudo piloto: HAFX, HDE e MAC.

2.3.12.1 Sessões Científicas

Durante a implementação do estudo foram realizadas sessões científicas de divulgação sobre a Doença de Chagas nos serviços de Obstetrícia das três instituições envolvidas, com a participação dos serviços de Patologia Clínica e Neonatologia.

2.3.12.2 Aspectos Éticos

O presente estudo foi elaborado de acordo com as normas de Boa Prática Clínica e de Investigação. A cada amostra correspondeu um número e a identidade das participantes e o número da amostra correspondente existiu apenas numa base de dados à qual somente teve acesso o responsável de serviço da instituição a que se dirigiu a grávida e o Investigador principal. Dados que revelassem a identidade das participantes não constarão em publicações ou comunicações de resultados obtidos.

O projecto para a realização deste estudo esteve sujeito a aprovação do conselho de ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e das comissões de ética de cada entidade envolvida na investigação, nomeadamente HAFX, HDE e MAC.

Durante o recrutamento de participantes e recolha de amostras, de forma a assegurar o bom desenvolvimento do protocolo de estudo e o correcto manuseio clínico das participantes foi fornecido todo o apoio técnico-científico necessário aos investigadores associados, nos serviços hospitalares que participaram no estudo.

2.3.12.3 Cronologia da Implementação do Estudo

Na ilustração 4 é possível verificar as acções desenvolvidas em cada uma das entidades hospitalares seleccionadas para o estudo, em função do tempo decorrido.

Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca	Contacto efectuado a 25/03/2011								
Hospital de São Francisco Xavier	Contacto efectuado a 30/03/2011	Submissão de protocolo a Comissão de Ética a 27/04/2011	Sessão de divulgação efectuada a 10/05/2011	Pré-teste realizado de 16/05/2011 a 30/05/2011	Parecer favorável da Comissão de Ética a 30/05/2011	Início do Estudo a 16/06/2011			
Hospital de Santa Maria		Contacto efectuado a 03/05/2011							
Hospital Dona Estefânia	Contacto efectuado a 23/03/2011	Sessão de divulgação e submissão de protocolo a Comissão de Ética a 29/04/2011				Parecer favorável da Comissão de Ética a 30/06/2011	Início do Estudo a 15/09/2011		
Maternidade Dr. Alfredo da Costa	Contacto efectuado a 23/03/2011					Submissão de protocolo a Comissão de Ética a 29/06/2011	Sessão de divulgação efectuada a 12/07/2011	Parecer favorável da Comissão de Ética a 25/10/2011	Início do Estudo a 05/12/2011
Hospital Garcia de Orta		Contacto efectuado a 03/05/2011							
Hospital de Faro	Contacto efectuado a 30/03/2011								



Ilustração 6 – Cronologia da Implementação do Estudo

2.3.13 Análise Estatística e Discussão de Resultados

A análise dos dados epidemiológicos foi realizada recorrendo ao *software IBM® SPSS Statistics* versão 19, utilizado uma base de dados de estatística descritiva. Para a mesma base de dados foram exportados e analisados os resultados contidos no programa *Microsoft® Office Excel 2007*, obtidos nos ensaios serológicos.

Foi realizada uma análise descritiva no que respeita aos dados epidemiológicos da amostra em estudo.

Foi avaliada a prevalência dos casos de Doença de Chagas na população de grávidas em estudo, de maneira a utilizar este dado para poder estimar a importância da doença na população de imigrantes latino-americanos em Portugal.

Foi realizada uma comparação entre os dois testes de rastreio no que respeita às vantagens e desvantagens da sua utilização e aos seus resultados. Quanto aos resultados observados foram comparados os sinais obtidos para cada amostra com ambos os ensaios através do teste estatístico *Wilcoxon* para amostras emparelhadas, utilizando o *software IBM® SPSS Statistics* versão 19.

Os resultados obtidos foram avaliados quanto à necessidade da implementação de programas de rastreio para a Doença de Chagas em latino-americanos em geral.

3 Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da População de Grávidas

3.1.1 Dimensão da Amostra

Neste estudo foram recrutadas 38 grávidas, cujos questionários foram considerados na caracterização da população. No entanto apenas 35 participantes realizaram a recolha de amostra de sangue, pelo que foi esse o número de amostras consideradas no rastreio serológico.

3.1.2 Entidades Onde Foram Recrutadas

As participantes deste estudo foram recrutadas em três entidades hospitalares. De acordo com o gráfico 2, cerca de 75,7% das participantes incluídas neste estudo foram recrutadas no Serviço de Obstetrícia do HSFY, o que corresponde a 28 grávidas. Este facto deve-se à precoce implementação do estudo neste hospital, quando comparado com as restantes entidades participantes. No HSFY o estudo foi iniciado a 16 de Junho de 2011, enquanto que no HDE (com 21,6% ou seja 8 grávidas) o início se deu no dia 15 de Setembro de 2011, e na MAC (2,7% ou seja 2 participantes) apenas em 5 de Dezembro de 2011.

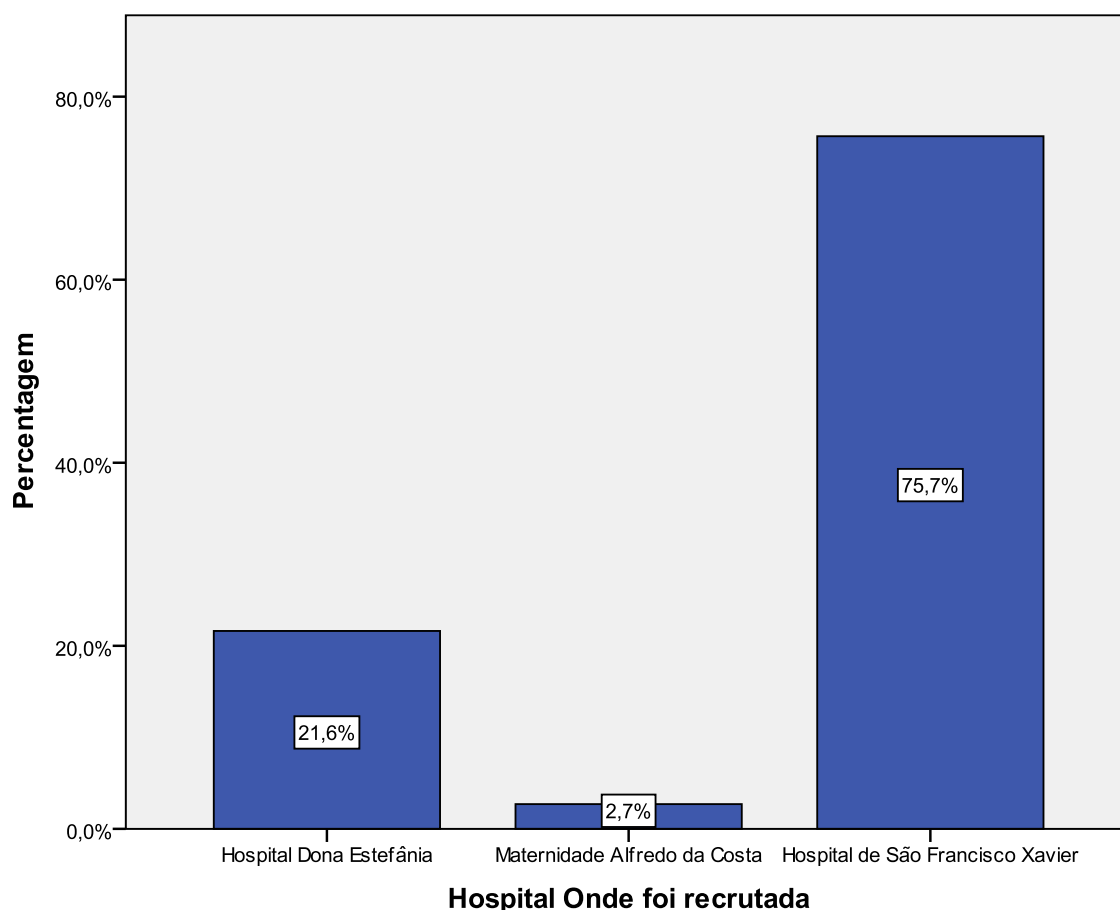


Gráfico 2 – Percentagem de participantes recrutadas em cada uma das entidades hospitalares.

3.1.3 Idade

No que respeita à caracterização da amostra em estudo através da sua idade, verifica-se que, de acordo com os dados presentes no gráfico 3, a idade das grávidas participantes varia entre os 17 e os 42 anos. Segundo dados da *International Organization for Migration*, os indivíduos latino-americanos que migram para a Europa são sobretudo mulheres em idade reprodutiva. Quanto à variação de idades existente na amostra em estudo considera-se que é a esperada, uma vez tratando-se unicamente de grávidas, encontrando-se por isso em idade reprodutiva. Na amostra estudada pode ainda observar-se, de acordo com o gráfico 3, que a idade modal corresponde aos 29 anos. Este dado encontra-se de acordo com as informações publicadas em 2009 pelo Observatório da Imigração, nas quais consta que as imigrantes brasileiras em Portugal possuem maioritariamente idades compreendidas entre os 25 e os 34 anos.

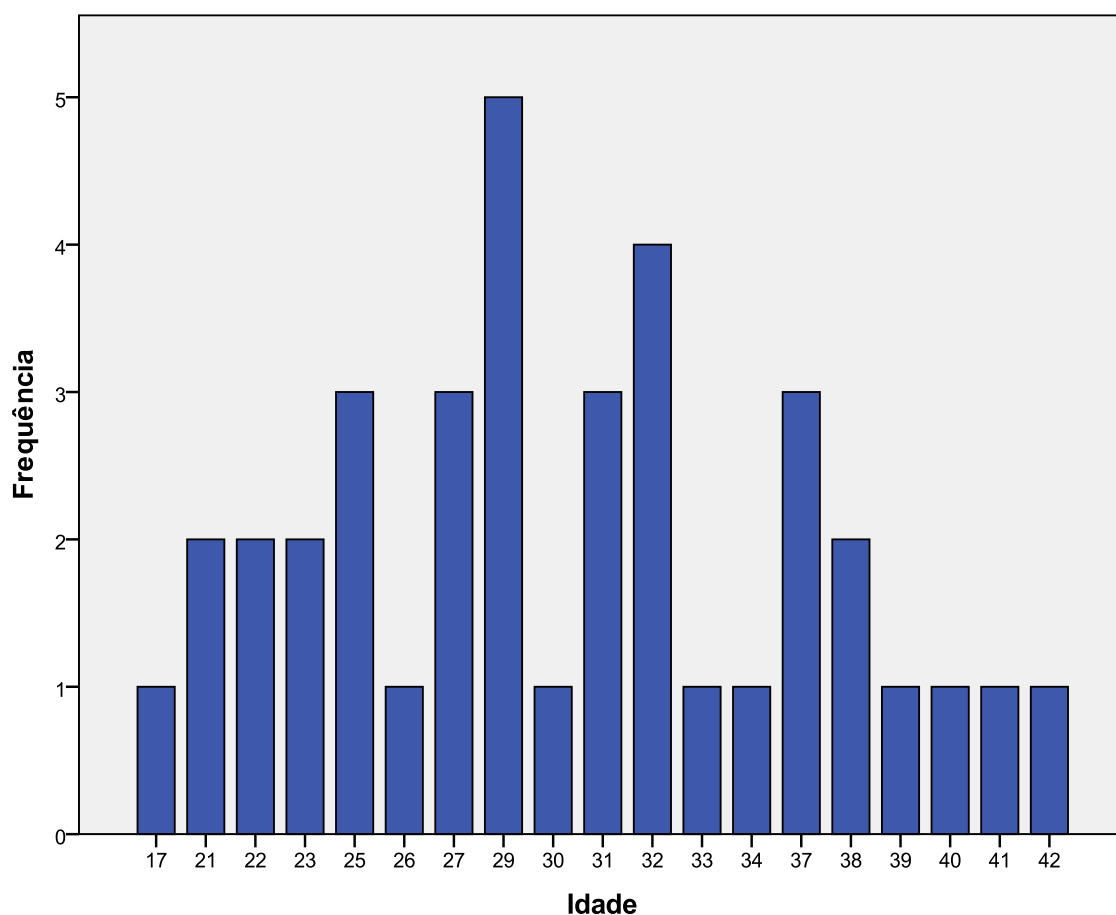


Gráfico 3 - Frequência das idades das participantes.

3.1.4 Motivo de Inclusão no Estudo

A todas as grávidas foram colocadas cinco questões para realização da selecção da amostra, sendo que uma qualquer resposta afirmativa entre essas questões corresponde ao motivo pela qual foi recrutada. Desta forma verifica-se que 36 das participantes do estudo foram incluídas nesta investigação por terem nascido em área endémica, como demonstra a tabela 8. Na mesma tabela pode verificar-se que 2 das grávidas foram recrutadas por terem realizado viagem por mais de um mês a um país de área endémica. Estas viagens foram realizadas no Brasil e no México. O facto de, numa amostra de 38 participantes, 5,3% delas serem recrutadas por este motivo, leva a crer que a população em risco de estar infectada com Doença de Chagas em Portugal possa ser eventualmente acrescido.

Tabela 8 – Motivo de inclusão no estudo.

Motivo de Inclusão no Estudo		
	Frequência	Percentagem
Nascimento na América Latina	36	94,7
Viagem por mais de um mês na América Latina	2	5,3
Total	38	100,0

Embora tivessem existido outros critérios de inclusão, como a residência em área endémica, realização de viagem por mais de um mês na América-latina (não aplicável a nascidas ou residentes em zona endémica), nacionalidade materna latino-americana, histórico de transfusão ou transplante em área endémica, ou ter trabalhado na América-latina, a primeira questão colocada às possíveis participantes como motivo de selecção foi o nascimento na América-latina. Deste modo, e como pode ser observado na tabela 10, dado que 94,7% das grávidas seleccionadas responderam afirmativamente a esta questão, considera-se este o principal motivo de selecção para a participação neste estudo piloto.

Pode ainda verificar-se que, como demonstra a tabela 9, nenhuma das participantes incluídas recebeu órgãos por transplante, mas duas delas receberam transfusão sanguínea em área endémica para a Doença de Chagas. As referidas participantes são oriundas do Brasil e Uruguai, onde a prevalência de dadores chagásicos estimada é de 0,21% e 0,47%, respectivamente (Organización Panamericana de la Salud 2006). Na mesma tabela pode verificar-se que 35 das participantes são filhas de latino-americanas, que também 35 delas residiram em área endémica, e que 25 trabalharam na América-latina. Quanto às residentes em área endémica foi possível avaliar o tipo de meio (rural ou urbano) em que se encontrava a habitação; e quanto às participantes que trabalharam na América-latina foi possível comparar o seu estatuto profissional no país de origem com o que assumiu em Portugal.

Tabela 9 – Frequência de respostas afirmativas pelas participantes quanto a recepção de órgão por transplante ou sangue por transfusão na América-latina, nacionalidade materna latino-americana, residência e desenvolvimento de actividade profissional em área endémica.

Mãe Latino-americana	Recepção de		Residiu na América Latina	Trabalhou na América Latina
	Transfusão Sanguínea na América Latina	Órgão por Transplante na América Latina		
Frequência	Frequência	Frequência	Frequência	Frequência
35	2	0	35	25

3.1.5 Proveniência das Participantes

Dado que a grande maioria das participantes nasceram em área endémica para a Doença de Chagas, foi possível avaliar a sua proveniência mais concretamente quanto ao seu país de origem.

Observando a tabela 10 é possível constatar que 97,2% das participantes nascidas em área endémica são originárias do Brasil. Este facto está totalmente de acordo com os dados mais recentes publicados pelo Serviço de Estrangeiros e Fronteiras nos quais se verifica que, entre a população migrante proveniente da América-latina, o Brasil é de facto o país de origem que mais se destaca em Portugal. De acordo com o Instituto Nacional de Estatística, as mulheres brasileiras são apontadas como sendo as residentes de origem estrangeira que mais dão à luz em Portugal. No entanto, no âmbito deste estudo, dado que a população estudada não corresponde a todas as mulheres estrangeiras mas apenas às latino-americanas, e não foram recrutadas mulheres que já deram à luz mas sim que se encontram grávidas. Neste estudo pode verificar-se que a maioria das grávidas latino-americanas residentes em Portugal são de origem brasileira. Embora tenha sido incluída uma participante nascida no Uruguai, segundo os dados mais recentes do Serviço de Estrangeiros e Fronteiras a população estrangeira residente em Portugal com oriunda do Uruguai corresponde apenas a cerca de 0,03% do total de residentes estrangeiros.

Tabela 10 – País de origem das participantes nascidas em área endêmica.

		Frequência	Percentagem
País de Origem	Brasil	35	97,2%
	Uruguai	1	2,8%
	Total	36	100,0%

Avaliando os dados contidos no gráfico 4, verifica-se que entre as participantes a proveniência variou entre 11 estados brasileiros: Ceará, Piauí, Rio Grande do Sul, Tocantins, Bahia, Espírito Santo, São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná.

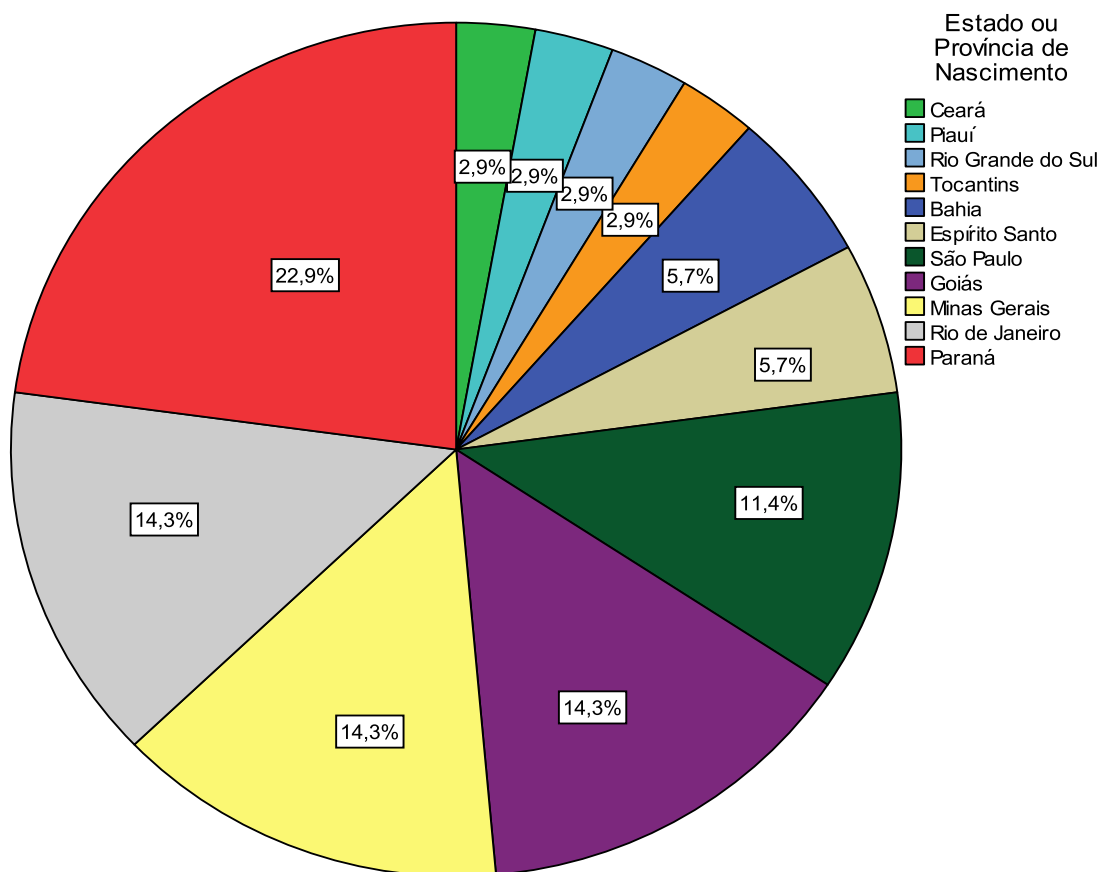


Gráfico 4 – Percentagem de participantes nascidas em cada estado brasileiro.

Vitória, Ipatinga e Rio de Janeiro, onde nasceram duas. Verifica-se ainda que uma das participantes nascidas no estado do Rio de Janeiro não indicou a localidade de onde é originária.

Tabela 11 – Localidade de nascimento das participantes recrutadas nascidas no Brasil, por estado.

Estado ou província de nascimento	Localidade de nascimento	Frequência
Bahia	Bom Jesus da Lapa	1
	Jequié	1
Ceará	Fortaleza	1
Espírito Santo	Vitória	2
Goiás	Anápolis	1
	Ceres	1
	Goiânia	3
Minas Gerais	Carlos Chagas	1
	Governador Valadares	1
	Ipatinga	2
	Pedra Azul	1
Paraná	Alto Paraná	1
	Cafelândia	1
	Guarapuava	1
	Janiópolis	1
	Paraná	1
	Loanda	1
	Londrina	1
	São Jorge	1
Piauí	Pimenteiras	1
Rio de Janeiro	<i>Não respondeu</i>	1
	Natividade	1
	Duque de Caxias	1
	Rio de Janeiro	2
Rio Grande do Sul	Porto Alegre	1
São Paulo	Cosmópolis	1
	São Paulo	3
Tocantins	Tocantínia	1

Segundo os autores Drumond e Marcopito os estados de Goiás, Bahia, Pernambuco, Paraná, Minas Gerais e São Paulo são aqueles que apresentam os maiores

números de óbitos devido a Doença de Chagas. O facto da maioria das participantes deste estudo serem provenientes de muitas dessas áreas revela ainda mais a importância da realização de um rastreio serológico nesta população.

3.1.6 Tipo de Habitação em Área Endémica

A transmissão vectorial em área endémica tende a ocorrer em habitações mais desfavorecidas, rurais, ou na periferia de zonas urbanas. Sendo que 35 das grávidas incluídas neste estudo afirmam ter residido na América Latina, como é verificado na tabela 9, foi-lhes pedido que classificassem o seu meio habitacional em área endémica como sendo rural ou urbano. Através do gráfico 5 é possível verificar que a maioria das participantes (70,6%) classificou o seu meio como urbano, embora existam grávidas que considerem ter habitado em áreas rurais e também em ambos os meios, rurais e urbanos.

Pode considerar-se que viveram em área rural no máximo 30% das participantes, que resulta da soma das grávidas que afirmam ter residido em meio rural e em ambos os meios. Assim, pode assumir-se que as participantes com maior risco de infecção por transmissão vectorial sejam até 30% da população estudada.

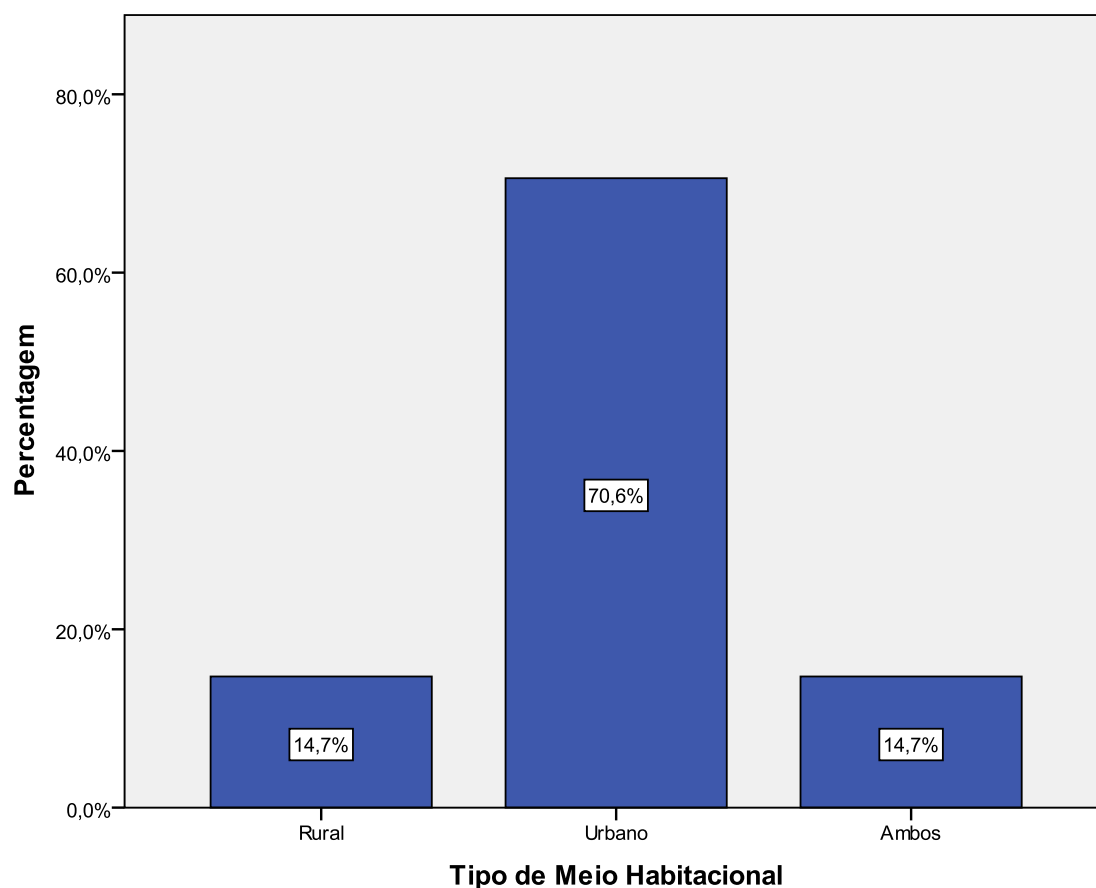


Gráfico 5 – Percentagem de respostas quanto à classificação do meio habitacional das participantes que residiram em área endémica.

Numa fase inicial deste estudo foi colocada em causa a realização desta questão pois colocava-se a hipótese de existirem participantes que tivessem dificuldades em classificar o seu meio habitacional como rural ou urbano. No entanto, esta questão foi ultrapassada com a realização de um pré-teste do questionário de estudo, realizado no HSFX, durante o qual não ocorreram dúvidas a este respeito.

3.1.7 Profissão das Participantes na América-latina e em Portugal

Através da observação da tabela 9 é possível verificar que 25 das participantes recrutadas afirma ter trabalhado no seu país de origem. Segundo publicação de 2009 da Revista Migrações, considera-se que os migrantes brasileiros em Portugal são indivíduos pouco qualificados. Segundo os dados que podem ser observados no gráfico 6 que associa a profissão exercida na América-latina à profissão exercida em Portugal por cada uma das participantes, verifica-se que entre as profissões exercidas na América-latina pelas 25 grávidas mencionadas anteriormente existem empregos pouco

qualificados mas também empregos que exigem algum grau de qualificação, como Engenharia e Enfermagem, o que faz desta amostra a representação de uma população heterogénea no que respeita às profissões no país de origem.

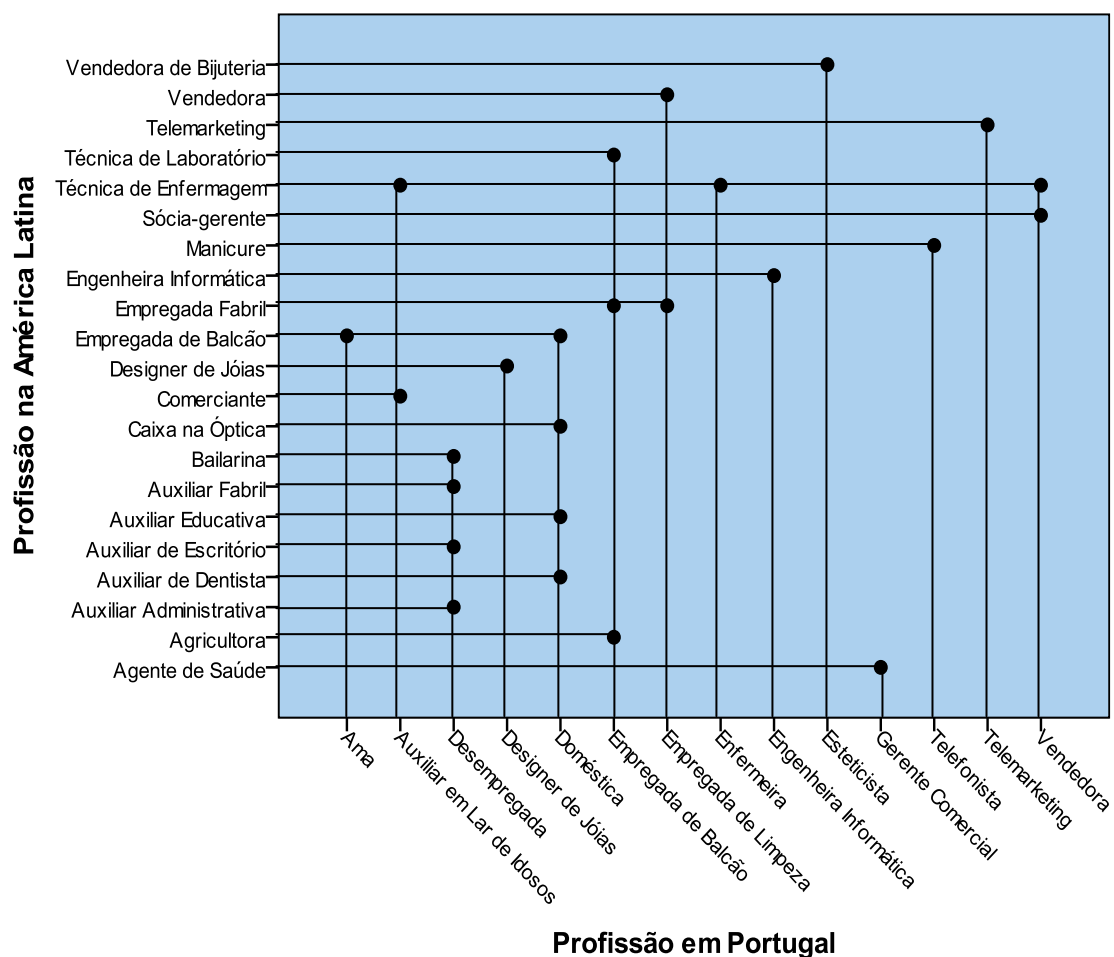


Gráfico 6 – Comparação entre a profissão exercida no país de origem e a exercida em Portugal, por cada participante.

Segundo publicação da Revista Migrações, alguns autores consideram que, de uma forma geral, os imigrantes latino-americanos conseguem na sua maioria exercer a sua profissão. Neste estudo verifica-se que, pela observação do gráfico 6, quatro das participantes mantiveram a profissão que exerciam no Brasil ao migrar para Portugal. Observa-se no entanto que a maioria das participantes não exerce em Portugal a profissão que exercia no seu país de origem, e quatro delas não só não mantiveram a

profissão como se encontram desempregadas em Portugal. Verifica-se ainda que a muitas das participantes trabalham em Portugal no sector do comércio ou em serviços domésticos, como foi já descrito em diversas publicações pela autora Beatriz Padilla. Estes dados servem para avaliar a situação sócio-económica das participantes, que se poderá reflectir no desejo de continuar em Portugal ou de migrar para um país europeu no qual encontrem melhores condições (fazendo de Portugal uma porta de entrada para a Europa), ou ainda de regressar ao país de origem.

3.1.8 Histórico de Doença de Chagas

A cada participante foi questionado o facto de já ter efectuado análises sanguíneas para diagnóstico de Doença de Chagas, e se possui familiares diagnosticados com esta patologia. Desta forma é possível avaliar não só se já foram efectuados rastreios para a Doença de Chagas na população estudada, como também verificar se a realização dos mesmos poderá estar de alguma forma relacionada com o facto de existirem familiares diagnosticados. A existência de familiares infectados com *T. cruzi* considera-se um indicador da probabilidade da participante ter estado em contacto com o parasita.

De acordo com os dados verificados na tabela 12, pode constatar-se que apenas uma das participantes afirma ter realizado análises sanguíneas para detecção de infecção por *T. cruzi*. Esta participante assinalou ainda no inquérito como negativo o resultado da referida análise. Embora a grávida em questão afirme já ter realizado um teste de rastreio com resultado negativo, a sua amostra de sangue foi processada de igual forma, dado não se saber se a participante poderá ter entrado em contacto com o agente da Doença de Chagas após a realização dessa análise. Verifica-se ainda na mesma tabela que cinco das participantes afirmam ter familiares diagnosticados com Doença de Chagas.

Tabela 12 – Relação entre o número e tipo de respostas das participantes quanto à realização de análises para diagnóstico da Doença de Chagas e à existência de familiares diagnosticados com a mesma.

		Existência de Familiares com Doença de Chagas		
		Sim	Não	Não sabe
Histórico de Análises para Diagnóstico de Doença de Chagas	Sim	0	1	0
	Não	5	21	7
	Não sabe	0	3	0

O facto de existirem familiares infectados torna mais importante a realização de um rastreio nestas participantes, dado que existe uma probabilidade acrescida de terem habitado no mesmo meio que indivíduos (familiares) infectados e podem por isso ter também entrado em contacto com o agente infeccioso. Por outro lado, a possibilidade de um dos familiares ser a própria mãe ou avó materna leva a que possa ter existido contacto com o parasita através de transmissão vertical. Com a mesma tabela pode verificar-se que três das participantes não sabem se alguma vez efectuaram uma análise sanguínea para despiste de Doença de Chagas, e sete das participantes que nunca a realizaram afirmam não saber se existem na sua família casos desta patologia. Estas respostas poderão indicar um desconhecimento sobre o que é a Doença de Chagas, que será mais provável entre as participantes não originárias de área endémica e que foram seleccionadas pela realização de viagem por mais de um mês à América-latina. Ambas as participantes seleccionadas por motivo de viagem, que não nasceram, não residiram e nem trabalharam em área endémica e não são filhas de latino-americanas escolheram a opção de resposta “não sei” em detrimento de “sim” e “não” no que respeita à existência de familiares diagnosticados com Doença de Chagas. Por terem estado na América-latina apenas em viagem podem não conhecer a patologia e por isso poderão não ter ideia se será possível existirem familiares infectados. De forma a saber se as participantes no estudo conhecem a Doença de Chagas seria necessário incluir no questionário efectuado essa questão.

3.1.9 Intenção de Dar à Luz em Portugal

Dado o controlo da transmissão vertical de Doença de Chagas não se resumir apenas ao rastreio em mulheres grávidas mas também aos seus filhos em caso de positividade materna, torna-se importante verificar se as grávidas participantes pretendem realizar o parto em Portugal, no que respeita à presente gravidez, e também a gravidezes futuras.

De acordo com os dados observados na tabela 13, todas as participantes pretendem dar à luz em Portugal, no que respeita à presente gravidez.

Tabela 13 – Frequência de respostas obtidas quanto à intenção de dar à luz em Portugal no que respeita à presente gravidez.

		Frequência
Intenção de dar à luz em Portugal	Sim	38
	Não	0
	Ainda não decidiu	0

Muitas das participantes recrutadas encontram-se já no final da gestação como se verifica no gráfico 7, sendo a moda do tempo de gestação 37 semanas. Sabe-se que em Portugal o início da vigilância na gravidez tende a ser mais tardio em mulheres migrantes do que em mulheres portuguesas, o que se pode reflectir na semana de gestação modal do gráfico 7, uma vez que muitas das participantes foi recrutada no decorrer da primeira consulta. No entanto neste estudo não é possível estabelecer uma comparação com o início da vigilância na gravidez em mulheres portuguesas.

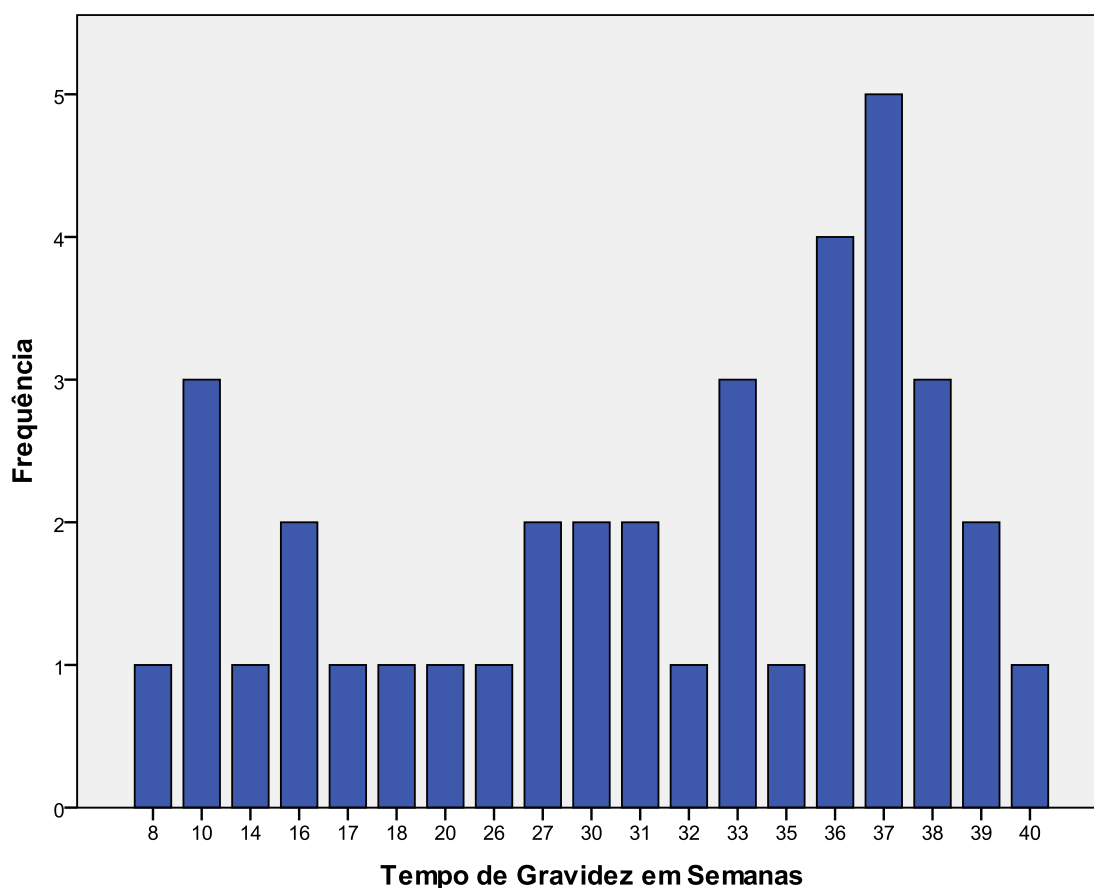


Gráfico 7 – Frequências observadas da semana de gravidez em que se encontram as participantes no dia em que são recrutadas.

O facto de todas as grávidas recrutadas realizarem o parto em Portugal indica que será fácil localizar a criança caso exista positividade materna para infecção por *T. cruzi*. Desta forma, nesses casos será possível avaliar o recém-nascido quanto à ocorrência de transmissão vertical e proceder ao seu acompanhamento médico. Uma vez detectada a infecção por *T. cruzi* numa grávida, é importante avaliar o recém-nascido não só após a presente gravidez, mas também outros filhos após gravidezes futuras. Assim, foi também questionada a cada participante a intenção de ter mais filhos em Portugal.

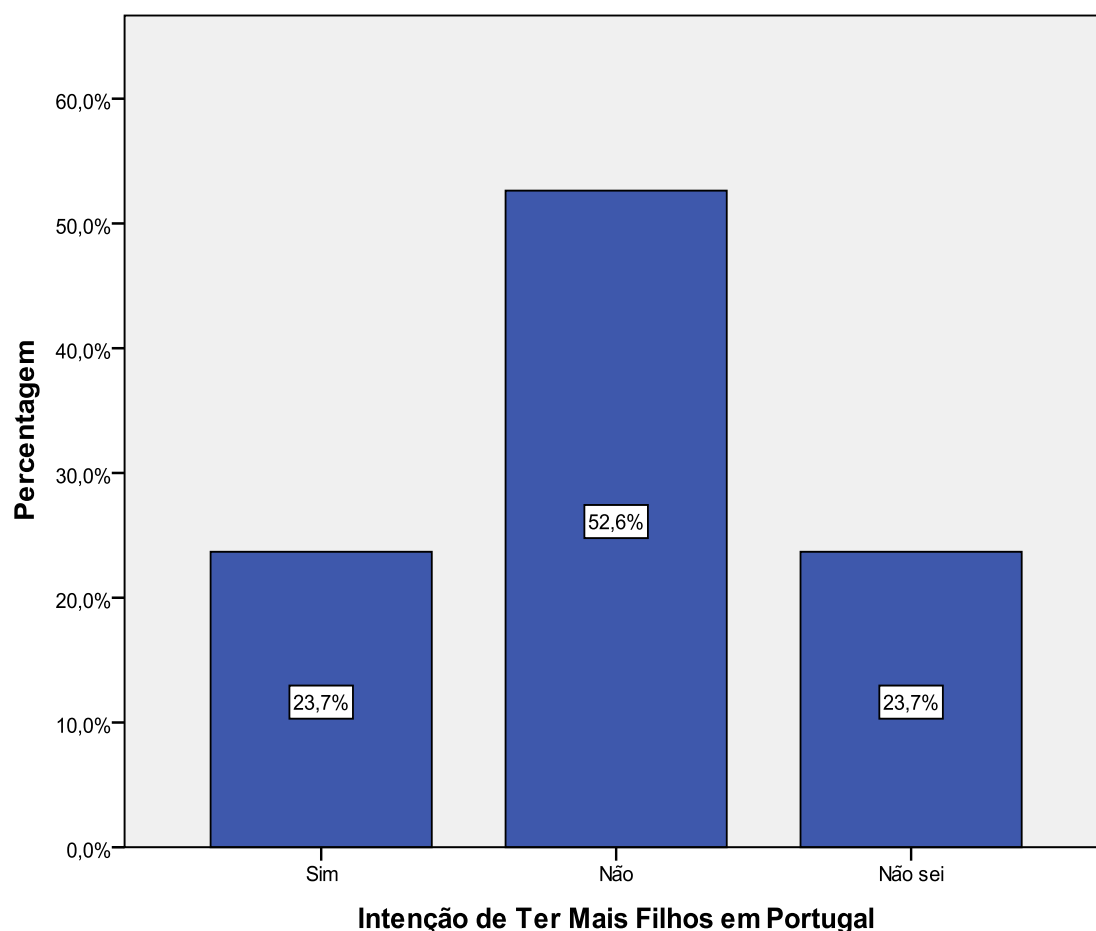


Gráfico 8 – Percentagem de cada resposta dada pelas participantes quanto à intenção de ter mais filhos em Portugal.

Cerca de 52,6% das participantes não pretende ter mais filhos em Portugal, o que constitui a maioria da amostra, como se verifica no gráfico 8. Esta maioria de respostas negativas poderá encontrar-se relacionada com o facto de muitas participantes se encontrarem em situações profissionais mais desfavorecidas, como é observado no gráfico 6, dado que em Portugal ocupam maioritariamente cargos de baixo vencimento.

Caso ocorra positividade para infecção por *T. cruzi* em alguma das participantes é também importante verificar se esta já tem filhos anteriores à presente gravidez, para que possam também ser avaliados quanto à Doença de Chagas, pois em caso de positividade materna não será possível averiguar se terá sido infectada posteriormente a gravidezes anteriores. Embora não tenha sido colocada às participantes uma questão sobre a existência de outros filhos, esse factor poderá ser contornado dado que a participante infectada terá que ser convocada pelo clínico responsável para avaliação do

recém-nascido. Assim, nesse momento poderá saber-se se existem já outros filhos aos quais se possa efectuar também o rastreio para Doença de Chagas.

3.2 Prevalência da Doença de Chagas em Grávidas Latino-americanas em Portugal

O presente estudo piloto teve como objectivo principal verificar a percentagem de casos positivos de Doença de Chagas numa amostra de grávidas consideradas de risco, de forma a poder inferir a prevalência da patologia nessa população. Como pode ser observado na tabela 14, todas as participantes recrutadas para este estudo revelaram um resultado negativo para infecção por *T. cruzi* em ambos os ensaios de rastreio efectuados, o que leva a que o diagnóstico seja considerado negativo para todas elas.

Tabela 14 – Resultados obtidos nas amostras com dois ensaios de rastreio utilizados.

		Resultado ELISA REM		
		Positivo	Negativo	Duvidoso
Resultado ELISA Ortho <i>Clinical Diagnostics</i>	Positivo	0	0	0
	Negativo	0	35 (100%)	0
	Duvidoso	0	0	0

Segundo dados de 2009 do Instituto Nacional de Estatística, nasceram nesse ano 3 786 crianças filhas de brasileiras em Portugal, sendo este valor referente a grávidas originárias de apenas um país endémico para Doença de Chagas e em situação legal em Portugal. Tendo em conta que o número de migrantes brasileiros em Portugal tem vindo a aumentar não se sabendo ao certo o número de migrantes ilegais, que existem em Portugal mulheres grávidas oriundas de outros países de área endémica para além do Brasil, e ainda que existem outras grávidas de risco para infecção por *T. cruzi* que não nasceram em área endémica, a população para a qual se pretende inferir a prevalência será bastante maior que 3 786 grávidas.

Assim, embora todos os casos estudados se tenham revelado negativos, considera-se que inferir uma prevalência de 0% para a população em causa quando a amostra avaliada corresponde apenas a 35 participantes não é válido, pois a amostra utilizada não será significativa. O cálculo estatístico de um número amostral significativo para inferir determinado dado para uma população é normalmente calculado através do tamanho da população em causa (Boslaugh & Watters 2008). No entanto neste estudo tal cálculo não pode ser efectuado, dado não ser conhecido o tamanho real da população de grávidas em risco. Assim sendo, e sabendo-se que quanto maior for a amostra maior potência terá para representar a população (Boslaugh & Watters 2008), impõe-se a necessidade de dar continuidade a este estudo.

O facto de, segundo dados de 2008 dos autores Amorim, Antunes e Matos terem sido apenas confirmados oito casos de Doença de Chagas em Portugal, e sabendo-se que 70% dos doentes se encontram na forma assintomática da patologia, o verdadeiro número de infectados em Portugal deverá ser maior. Tratando-se este de um estudo piloto, a continuidade da realização deste rastreio a grávidas nas entidades participantes será garantido. Para que se possa aferir um valor de prevalência para a população total em risco em Portugal será necessária a implementação do estudo noutras entidades, não só nos serviços de obstetria mas também nos serviços de transfusão sanguínea, transplantação, cardiologia, gastroenterologia e clínica geral.

3.3 Dificuldades Sentidas Durante o Estudo

Durante a implementação e realização deste estudo piloto foram sentidas diversas dificuldades, muitas delas levando ao atraso da obtenção de resultados.

3.3.1 Implementação do Estudo

Em três dos hospitais contactados não foi possível implementar o estudo por razões variadas (envolvimento em outros protocolos de estudo e dificuldades logísticas). Nos três restantes hospitais a implementação do estudo foi difícil, dado tratar-se de um estudo multicêntrico e que para ser executado necessita da colaboração entre diversos profissionais de saúde, muitos deles com escassos conhecimentos sobre a Doença de Chagas. Esta dificuldade foi contornada numa primeira fase de implementação do estudo, em que os directores dos serviços envolvidos foram contactados, tendo sido agendadas sessões clínicas para divulgação sobre a Doença de Chagas e o protocolo que

se pretendia executar. No entanto, a informação entre profissionais de saúde nem sempre circulou com rapidez, e algumas sessões clínicas foram agendadas para a altura do Verão, na qual muitos profissionais se encontravam em período de férias.

A submissão do protocolo nas diferentes comissões de ética, realizado a par das sessões clínicas, tomou mais tempo que o esperado. Embora já com aprovação da comissão de ética do IHMT, cada instituição solicitou documentos específicos para posterior parecer para além do protocolo de estudo, questionário, consentimento informado e currículos dos investigadores. O tempo de resposta das comissões de ética foi variado, tendo sido a resposta mais rápida obtida pelo Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental para implementação no HSFX, em um mês e três dias, e a mais demorada pela MAC, em três meses e 26 dias. A avaliação realizada pela comissão de ética da MAC coincidiu com alterações efectuadas quanto aos membros que a compunham, o que poderá estar relacionado com o tempo de resposta.

Com a aprovação das comissões de ética, o estudo foi iniciado nas entidades participantes entre 16 dias e dois meses e meio após a recepção do documento comprovativo. Tal deveu-se à necessidade de organizar uma comunicação entre os serviços de obstetria e de patologia clínica, que exigiu uma coordenação entre muitos e diferentes profissionais de saúde, desde administrativos a enfermeiros, técnicos e médicos. O facto de nem todos os profissionais pertencentes aos serviços envolventes participarem no recrutamento de grávidas poderá ter contribuído em grande parte para que o número de participantes fosse tão diminuído. No caso do HSFX foram apenas os dois investigadores associados ao estudo pelo hospital que recrutaram participantes, e na MAC também apenas as três investigadoras associadas participaram activamente no recrutamento. No HDE, embora existisse no serviço de obstetria apenas uma investigadora associada, foi possível mobilizar outros obstetras para o recrutamento de participantes.

3.3.2 Recrutamento de Participantes e Separação de Amostras Biológicas

Dependendo da instituição, a prescrição de análises clínicas de rotina por parte do clínico é efectuada em impresso (papel) ou informaticamente, o que fez com que, de acordo com o método utilizado, fosse necessário adaptar a forma com que no serviço de patologia clínica fossem identificadas as participantes. As formas encontradas de comunicação entre os dois serviços foram sugeridas pelos profissionais de saúde envolvidos no estudo. No caso do HSFX, dado a prescrição ser em impresso, para

identificação das participantes e separação de sangue para o estudo foi fornecido às mesmas durante a consulta uma folha de protocolo que foi anexada à requisição das análises clínicas e que seria entregue pela grávida no serviço de patologia clínica. No entanto, muitas das participantes não entregaram a referida folha de protocolo no serviço de patologia clínica, o que fez com que nesses casos o soro ou plasma não fosse separado para o estudo. No HDE sucedeu o mesmo, embora a prescrição de análises fosse realizada informaticamente e a chamada de atenção quanto à participação no estudo fosse efectuada por computador, dado que de alguma forma a informação nem sempre chegou aos técnicos que realizam a colheita de sangue. Estas situações foram contornadas graças à existência de serotecas armazenadas em ambos os serviços de patologia clínica, que foram identificadas de acordo com o número de processo constante nos questionários preenchidos e sem amostra separada para o estudo. No caso do HDE a seroteca encontra-se noutro hospital do mesmo centro hospitalar, o Hospital de São José, onde são processadas amostras de sangue com pedidos para a secção de imunologia, pelo que foi necessário que fossem transportadas novamente para o HDE. Quanto à MAC, sendo a prescrição de análises clínicas efectuada em impresso, foram as próprias requisições assinaladas, com um autocolante colorido, para alertar o profissional do serviço de patologia clínica sobre o facto de se tratar de uma grávida recrutada para o estudo. Na MAC não foram verificados problemas quanto à separação de amostra embora tenha sido processada apenas uma, dado ter sido a última instituição a iniciar o estudo. Possivelmente para a realização de um estudo que envolva uma comunicação clara entre dois serviços, será necessário futuramente promover reuniões com os profissionais de saúde envolvidos, de forma a esclarecer a origem e solução das falhas de comunicação existentes.

Ainda referente ao recrutamento de participantes e separação de amostras, importa referir que, no HSFEX existiram dois casos que impossibilitaram a utilização de dados para análise estatística. O primeiro caso corresponde a uma grávida recrutada na consulta de obstetrícia que preencheu o questionário de estudo e assinou o consentimento informado, mas realizou o parto antes de efectuar as análises clínicas que lhe tinham sido prescritas, pelo que não foi possível obter a sua amostra de sangue. Tentou-se posteriormente entrar em contacto com a participante mas esta não se dirigiu mais à instituição desde o parto. O segundo caso consiste numa amostra de sangue colhida no serviço de urgência a uma grávida que afirmava ser participante neste estudo, mas o seu questionário e consentimento informado não se encontravam no local em que

iam sendo habitualmente guardados pelos obstetras responsáveis. Desta forma, na ausência de consentimento informado, a amostra em questão não foi utilizada para análise neste estudo.

Tanto na MAC como no HDE foi ainda verificada a existência de um questionário e respectivo consentimento em cada uma das instituições cujas amostras de sangue ainda não tinham sido colhidas dado que as participantes ainda não tinham efectuado as análises de rotina até à data.

Quanto à hipótese de ser efectuada uma colheita de sangue de cordão umbilical durante o parto de todas as participantes para pesquisa de *T. cruzi* em caso de positividade materna, colocou-se mais uma vez o problema de se tratar de um assunto que envolve uma comunicação clara entre dois serviços. Para além desta questão, verificou-se que a implementação deste procedimento seria bastante mais complicada no HDE, dado que os partos não são realizados no referido hospital, mas sim na MAC, pelo que seria necessária uma comunicação entre instituições. De forma a contornar esta dificuldade foi colocada a possibilidade de ser efectuado posteriormente um diagnóstico laboratorial com sangue do recém-nascido. No entanto, dado nenhuma das participantes ser positiva para infecção por *T. cruzi*, nenhum destes procedimentos foi necessário durante o estudo piloto.

3.3.3 Continuidade do Estudo

Tratando-se de um estudo piloto, as dificuldades esperadas e inesperadas que surgiram e as suas soluções permitirão tirar lições para o futuro, no que respeita não só à continuidade desta investigação como à realização de outros estudos multicêntricos ou dissertações académicas.

3.4 Ensaios Serológicos Disponíveis em Portugal

Para a realização deste estudo foram contactadas 18 casas comerciais que comercializam ensaios para rastreio e diagnóstico da Doença de Chagas, sendo que foram obtidas respostas de 13. Destas, foi verificado que duas comercializam *kits* de reagente de IFI, e cinco comercializam ensaios ELISA, em Portugal. Quanto a IFI, ambas as empresas, *LabClinics/Bios* e *MarDx/TrinityBiotech*, forneceram informação insuficiente para que fosse estabelecida uma comparação no que respeita à *performance* dos ensaios, quer pela sensibilidade quer pela especificidade. No entanto, foi possível saber que o custo por teste, entre as duas empresas, é menor com a utilização do ensaio

da *MarDx/TrinityBiotech*. Quanto aos fabricantes que comercializam ensaios ELISA foram obtidas respostas que permitiram estabelecer comparações e seleccionar o melhor teste de acordo com o critério comparado. As empresas que forneceram informação sobre sensibilidade, especificidade e preço foram a *REM*, *Ortho Clinical Diagnostics*, *Izasa/Biokit*, *BLK* e *BioRad/Vircell*. Segundo os dados revelados por cada fabricante, os melhores ensaios encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 – Melhores ensaios ELISA comercializados em Portugal de acordo com informação dos fabricantes sobre sensibilidade, especificidade e preço.

	Maior Sensibilidade	Maior Especificidade	Melhor Preço
Casas	<i>BioRad/Vircell</i> ,	<i>OrthoClinicalDiagnostics</i> ,	<i>REM</i>
Comerciais	<i>OrthoClinicalDiagnostics</i> , <i>REM</i>	<i>BLK</i>	

De acordo com as informações obtidas, as empresas *BioRad/Vircell*, *OrthoClinicalDiagnostics* e *REM* destacam-se quando o critério avaliado é a sensibilidade, demonstrando valores de 100%. Quanto à especificidade foi verificado que tanto a *OrthoClinicalDiagnostics* como a *BLK* obtêm valores de 100%. No que respeita ao preço dos *kits* de reagente, embora não tenha sido obtida informação a esse nível por parte da *Izasa/Biokit*, verifica-se que de entre as restantes casas comerciais se destaca a *REM*, pois comercializa um *kit* de 480 testes por 600€, o que leva a um custo de cerca de 1,25€ por teste realizado. No entanto segundo estes dados, no que respeita a uma avaliação da *performance* esperada pelos fabricantes, é o ensaio da *Ortho Clinical Diagnostics* que se destaca pelos seus valores elevados de sensibilidade e especificidade.

3.5 Utilização dos kits *Ortho Clinical Diagnostics* e *REM*

Neste estudo foram utilizados como testes de rastreio para a infecção por *T.cruzi* dois ensaios ELISA, das empresas *REM* e *Ortho Clinical Diagnostics*. Desta forma foi possível estabelecer comparações quanto à sua utilização no processamento das

amostras. Assim, foram avaliados critérios de utilização importantes para um processamento fiável das amostras, rápido e de fácil realização: o tempo dispendido em cada corrida, a necessidade de preparação de reagentes por parte do operador, os critérios de controlo de qualidade associados ao ensaio, a necessidade de utilização de reagentes que não constem no *kit*, a clareza do documento informativo (bula) dos reagentes e ainda a interpretação dos resultados. Na tabela 16 encontram-se as características anteriormente referidas de cada um dos *kits* utilizados, de forma a poderem ser comparados.

Tabela 16 - Comparação entre os *kits* de ELISA da *REM* e *Ortho Clinical Diagnostics* quanto à sua utilização.

Critério de Utilização	<i>REM</i>	<i>Ortho Clinical Diagnostics</i>
Tempo total dispendido em cada corrida (aproximado)	140min. (2horas e 20min.)	195min. (3 horas e 15min.)
Tempo de incubação em cada corrida	75 min. (1hora e 15min.)	120min. (2horas)
Reagentes que necessitam de preparação	Solução de lavagem	Solução de lavagem e solução substrato
Crítérios de controlo de qualidade	Monitorização de adição/omissão de amostra, aceitação do branco, aceitação do controlo negativo, aceitação do controlo positivo	Monitorização de adição/omissão de amostra, monitorização de omissão do conjugado, aceitação do branco, aceitação do calibrador positivo, aceitação do controlo negativo
Reagentes não fornecidos	Nenhum	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 4N e tampão de lavagem concentrado
Explicações na bula	Claras	Claras
Interpretação de resultados	Positivas, negativas e zona cinzenta	Positivas e negativas

Estabelecendo uma comparação entre os dois ensaios ELISA utilizados, verifica-se que com a utilização do *kit* da *Ortho Clinical Diagnostics* existem tempos de incubação mais longos, o que se considera à partida uma desvantagem no que respeita à rapidez com que são reportados os resultados. No entanto, o tempo total dispendido na realização de um ELISA desta casa comercial é longo não só pelos tempos de incubação, mas também pela existência de um maior número de operações relacionadas com controlo de qualidade em relação ao *kit* da *REM*. Assim sendo, a desvantagem de

ser mais longo anula-se com a vantagem de ter mais critérios de controlo de qualidade de forma a garantir a fiabilidade dos resultados.

Quanto aos reagentes não fornecidos, verifica-se claramente uma vantagem com a utilização do ensaio da empresa *REM*, pois todos os reagentes necessários à técnica são encontrados no *kit*. Para a realização do ensaio da *Ortho Clinical Diagnostics* foi utilizado neste estudo ácido sulfúrico preparado nas instalações do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, tendo sido o tampão de lavagem fornecido pela *Ortho Clinical Diagnostics*.

Quanto à interpretação dos resultados, o facto de ser considerada a existência de uma zona cinzenta confere uma vantagem na utilização do *kit* da *REM*, dado que é aconselhada a realização de um novo ensaio em amostras incluídas nesse intervalo para confirmação de reactividade. Sabe-se que todas as amostras positivas num teste considerado de rastreio deverão ser confirmadas através de outra metodologia, no entanto, segundo esta consideração, as amostras negativas não serão mais testadas. Assim, não sendo considerada no *kit* da *Ortho Clinical Diagnostics* uma zona cinzenta, amostras muito perto do *cut-off* mas abaixo dele não são novamente testadas por serem imediatamente consideradas negativas, o que leva a que este facto seja considerado como uma desvantagem. No entanto, tal desvantagem não se aplica neste estudo, uma vez que todas as amostras, mesmo sendo negativas, foram testadas com dois *kits* de rastreio, sendo no ensaio da *REM* considerada uma zona cinzenta. De qualquer forma, na eventual utilização apenas do *kit* da *Ortho Clinical Diagnostics* como rastreio, poderá o próprio operador calcular um intervalo que considere como zona cinzenta de acordo com as características do ensaio e aplicá-lo após o cálculo do valor de *cut-off*.

3.6 Comparação de Resultados Obtidos entre os Kits Utilizados

Dado não existirem neste estudo piloto resultados positivos para Doença de Chagas, não foi possível realizar uma comparação efectuando testes de concordância, não tendo sido assim avaliadas a PPA nem a NPA. Desta forma, foram comprados os resultados obtidos em sinal para cada amostra, em cada *kit* utilizado. O cálculo do sinal é efectuado através da divisão da DO obtida na leitura pelo espectrofotómetro pelo *cutoff* calculado nesse ensaio, como demonstra a equação 1.

Equação 1 - Cálculo do sinal para cada amostra.

$$Sinal = \frac{DO}{Cutoff}$$

Para cada vez que são processadas amostras (cada corrida), é calculado um valor de *cutoff* de acordo com os valores obtidos de calibradores ou controlos negativos (dependendo do fabricante). De acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* e as especificações dos fabricantes, uma amostra é considerada positiva se o seu sinal calculado for igual ou superior a um, ou seja, se a DO obtida na leitura for igual ou superior ao valor de *cutoff* calculado para essa corrida. Assim, enquanto que a interpretação de um resultado de DO depende do valor de *cutoff* calculado para cada corrida, o sinal é interpretado sempre da mesma forma. Ao eliminar a interferência do factor *cutoff*, que é variável, pode ser estabelecida uma comparação quantitativa de resultados. Para este fim foram utilizados os sinais calculados para cada amostra, e não as DO observadas na leitura.

De forma a saber que teste estatístico utilizar para a comparação entre os sinais obtidos com cada *kit* de reagente foi necessário verificar se estas variáveis assumem uma distribuição normal. Dado o tamanho da amostra ser inferior a 50, para testar a normalidade foi realizado o teste *Shapiro-Wilk*, mais adequado para amostras de pequena dimensão (Maroco 2007). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 17.

Tabela 17 – Teste de normalidade para as variáveis a comparar.

	Teste de Normalidade
	<i>Shapiro-Wilk</i>
	Sig.
Sinal obtido com <i>Ortho Clinical Diagnostics</i>	0,000
Sinal obtido com <i>REM</i>	0,000

A hipótese nula deste teste estatístico considera que a variável em questão demonstra uma distribuição normal (Maroco 2007). A hipótese nula é rejeitada se o nível de significância (Sig.) se revelar inferior a 0,05 (Maroco 2007). Assim, observando os resultados da tabela 17 conclui-se que os sinais obtidos com ambos os *kits* não assumem distribuições normais, uma vez que a hipótese nula é rejeitada.

Quando a normalidade da distribuição não é verificada, deverão ser utilizados como testes estatísticos os testes não paramétricos (Boslaugh & Watters 2008). O teste de *Wilcoxon* é um teste não paramétrico que compara a distribuição entre duas variáveis relacionadas contínuas (Maroco 2007), como é o caso das variáveis “Sinal obtido com *Ortho Clinical Diagnostics*” e “Sinal obtido com *REM*”. Desta forma, foi aplicado o teste estatístico de *Wilcoxon* para comparação entre os sinais obtidos nas amostras com os ensaios das duas casas comerciais escolhidas. Neste teste estatístico considera-se como hipótese nula a média das diferenças entre as duas variáveis ser igual a zero (Maroco 2007).

Tabela 18 – Resultados obtidos com o teste de hipóteses *Wilcoxon*.

Teste de Hipóteses	Sig.	Decisão
<i>Wilcoxon</i>	0,617	Aceita a hipótese nula.

Como pode ser observado na tabela 18, a hipótese nula é aceite, ou seja, verifica-se que as médias das classificações das diferenças entre os sinais obtidos com a *Ortho Clinical Diagnostics* e com a *REM* são iguais. Assim, pode assumir-se que os resultados obtidos com os dois *kits* não diferem significativamente. Estes resultados permitem que

o mesmo paciente possa ser monitorizado quer com um quer com outro ensaio, pois admite-se que a variação inter-ensaio seja a mesma.

4 Conclusão

Com os resultados obtidos neste estudo piloto verifica-se que não existem grávidas infectadas por *T. cruzi* na amostra estudada. As participantes foram na sua maioria recrutadas no HSFX, dado ter sido a primeira instituição a iniciar o estudo. De forma a avaliar a prevalência da Doença de Chagas numa porção significativa da população de grávidas em risco é necessário que este estudo continue a ser efectuado nas instituições em que foi implementado, e ainda que outras participem igualmente nesta investigação, nomeadamente as entidades já contactadas. Uma vez que foram já confirmados oito casos de Doença de Chagas em Portugal e os dados referentes ao total de infectados em países sem transmissão vectorial correspondem na sua maioria a estimativas, a continuidade deste estudo piloto deverá ser mantida. Para tal, conclui-se que a utilização do questionário aplicado a esta investigação é adequado, uma vez que poderão ser detectados casos não só em participantes nascidas em área endémica, como a toda a população de grávidas em risco que possa residir em Portugal. Com a utilização deste questionário foi ainda possível obter uma boa caracterização epidemiológica da população de grávidas em estudo, e concluir que apenas cerca de 30% destas terão um risco acrescido de infecção por transmissão vectorial.

Durante a realização desta investigação surgiram limitações relacionadas com o facto de se tratar de um estudo multicêntrico com tempo limitado para conclusão. Surgiram atrasos nomeadamente ao nível das respostas por parte das comissões de ética e ao nível do processo de implementação do estudo que levaram a que o número de participantes não alcançasse o esperado.

Com este estudo-piloto foi possível avaliar a proveniência das grávidas migrantes latino-americanas e obter desta forma dados actuais sobre a referida população. Conclui-se assim que a maioria das grávidas estrangeiras de origem latino-americana em Portugal são brasileiras, e exercem profissões maioritariamente relacionadas com o comércio e os serviços domésticos. Dadas as actuais dificuldades económicas sentidas na Europa e particularmente em Portugal e o crescente desenvolvimento dos países da América Latina será interessante, com a continuidade do estudo, verificar se a comunidade brasileira em Portugal continuará a destacar-se no que respeita aos partos de mulheres estrangeiras em Portugal.

Para a continuidade desta investigação conclui-se que existem formas de evitar alguns erros ocorridos durante a realização do estudo piloto. Assim, deverão

promovidas reuniões entre profissionais de saúde para que a informação circule mais rápida e claramente. Quanto aos testes serológicos a utilizar, deverá ser tido em consideração que, no que respeita à *performance* dos ensaios ELISA disponíveis em Portugal, a *Ortho Clinical Diagnostics* apresenta um melhor desempenho, segundo os fabricantes. Este *kit*, embora com critérios de controlo de qualidade bastante apertados (o que garante maior fiabilidade), é de fácil utilização. No entanto, no que respeita aos custos, as empresas *REM* e *MarDx/TrinityBiotech* fornecem os reagentes para ELISA e IFI (respectivamente) menos dispendiosos. Conclui-se que, no que respeita a resultados de pacientes, tanto a *Ortho Clinical Diagnostics* como a empresa brasileira *REM* apresentam valores que não diferem significativamente. Dado o *kit* da empresa *REM* ser menos dispendioso e fornecer todos os reagentes necessários à realização do ensaio, este considera-se uma boa escolha para laboratórios com menos recursos financeiros.

Através da realização deste estudo pode ainda considerar-se que Portugal é um país que ainda não despertou para a problemática da emergência da Doença de Chagas em países não endémicos. Há ainda um longo caminho a percorrer no nosso país, uma vez que esta patologia é quase desconhecida pela maioria dos profissionais. A realização de sessões clínicas informando diversos profissionais de saúde sobre a emergência da Doença de Chagas torna-se essencial para a continuidade do estudo. O apoio de entidades como o Ministério da Saúde será igualmente desejável, para que esta investigação não se resuma apenas a um estudo piloto, e se torne num rastreio multicêntrico para estudo de prevalência, a nível nacional.

5 Bibliografia

- Albajar-Vinas, P. & Jannin, J., 2011. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Eurosurveillance*, 16(38). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21958529>.
- Alberts, B. et al., 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed., New York: Garland Science.
- Alonso, M.T. et al., 1966. Doença de Chagas e Gravidez. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8(4), pp.184-185. Disponível em: http://www.imt.usp.br/portal/stories/dmdocuments/vol09_f1/393-396.pdf [Consultado em December 18, 2011].
- Amorim, A., Antunes, F. & Matos, O., 2008. Doença de Chagas em residentes em Portugal: importância da confirmação do diagnóstico na prevenção da transmissão de *Trypanosoma cruzi* por transfusão sanguínea. *Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica, Sida e Parasitologia*, 23(Abstract book).
- Andrade, S. G. & Magalhães, J.B., 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), pp.27-35. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8993106>.
- Andrade, Sonia Gumes, 2009. The role of *Trypanosoma cruzi* and its antigens on the pathogenesis of Chagas' disease miocardiopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(Sup. II), pp.46-51.
- Arandes, A.S. et al., 2009. Prevalence of Chagas disease in the Latin American immigrant population in a primary health centre in Barcelona (Spain). *Acta tropica*, 112(2), pp.228-30. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631185> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Assal, A. et al., 2006. Implementation of Chagas disease screening in the French blood donor population. Evaluation and selection of screening assays. In *XXIXth International Congress of the International Society of Blood Transfusion*. Cape Town.
- Basile, L. et al., 2011. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance*, 16(37), pp.1-10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21944556>.
- Bern, C. et al., 2007. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: a Systematic Review. *The Journal of the American Medical Association*, 298(18), pp.2171-2181. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000201> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].

- Bittencourt, A.L., 1992. Possible Risk Factors for Vertical Transmission of Chagas' Disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34(5), pp.403-408.
- Boslaugh, S. & Watters, P.A., 2008. *Statistics in a Nutshell* First Edit. M. Treseler, ed., Sebastopol: O'Reilly Media.
- Burmester, G.-R. & Pezzutto, A., 2005. *Imunologia - Texto e Atlas* LIDEL, ed., Lisboa: Lidel Edições Técnicas.
- Bógus, L.M.M., 2007. II - Esperança além-mar: Portugal no "Arquipélago Migratório" brasileiro. In ACIDI, ed. *Imigração Brasileira em Portugal*. Lisboa: Artipol, pp. 39-58.
- Caballero, Z.C. et al., 2007. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(8), pp.1045-1049. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2044488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado em 30 de Setembro, 2011].
- Carod-Artal, F.J. & Gascon, J., 2010. Chagas disease and stroke. *Lancet neurology*, 9(5), pp.533-42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20398860> [Consultado em 12 de Agosto, 2011].
- Castilho, E.A. & Silva, G.R., 1976. Maternal Chagas' Infection and Prematurity. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18(4), pp.258-260.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíase humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp.159-218.
- Chappuis, F. et al., 2010. Validation of a Rapid Immunochromatographic Assay for Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection among Latin-American Migrants in Geneva, Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8), pp.2948-2952. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2916554&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado em 26 de Julho, 2011].
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance ; Approved Guideline* Secon Edit., Wayne, PA.
- Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED, 2007. *Formulario Terapéutico CONAMED* Cuarta Edi. Consejo de Administración de la Fundación CONAMED, ed., Buenos Aires: Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED.
- Comissão das Comunidades Europeias, 2006. Directiva 2006/17/CE da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, p.L 38/40.

- Cook, G.C. & Zumla, A.I., 2009. *Manson's Tropical Diseases* 22nd ed. Cook & Zumla, ed., China: Saunders Elsevier.
- Cunha-Neto, E. et al., 1996. Autoimmunity in Chagas' Disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 98(8), pp.1709-1712.
- Department of Economic and Social Affairs in the United Nations Secretariat, 2009. *Trends in International Migrant Stock: the 2008 Revision*, New York.
- Dias, E. et al., 1956. Chagas' Disease; a Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation*, 14(6), pp.1035-60. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13383798>.
- Dias, J.C.P., 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(4), pp.370-375.
- Dias, S.F., Rocha, C.F. & Horta, R., 2009. *Saúde Sexual e Reprodutiva de Mulheres Migrantes Africanas e Brasileiras* Alto-Comissariado para a Imigração e Diálogo Intercultural, ed., Lisboa: Artipol.
- Drugs for Neglected Diseases initiative, 2011. *New Child-Adapted Chagas Disease Treatment Approved for Registration*, Rio de Janeiro, Recife, Geneva. Disponível em: <http://dndi.org/press-releases/1016-paedbenz.html>.
- Drumond, J.A.G. & Marcopito, L.F., 2006. Migração interna e a distribuição da mortalidade por doença de Chagas, Brazil, 1981/1998. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(10), pp.2131-2140.
- El-Sayed, N.M. et al., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), pp.409-15. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725> [Consultado em 19 de Julho, 2011].
- Filho, A.A.F., Silva, M.A.D. & Boainain, E., 1995. Ethiological treatment of acute and chronic Chagas' heart disease. *São Paulo Medical Journal*, 113(2), pp.867-872.
- Flores, M. et al., 2008. *Recomendaciones para el control de la infección por Trypanosoma cruzi / Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas*, Madrid.
- Flores-Chávez, M. et al., 2009. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(5), pp.284-93. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962790> [Consultado em 27 de Outubro, 2011].
- Flores-Chávez, M. et al., 2008. Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases Journal*, 1. Disponível em:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2585580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].

Flores-Chávez, M. et al., 2006. *Evaluación de técnicas de diagnóstico serológico de la infección por Trypanosoma cruzi*. Centro Nacional de Microbiología.

Flores-chávez, M. et al., 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(Supl. 3), pp.29-37.

Fondation Merieux & World Health Organization, 2008. *Focus on Neglected Tropical Diseases: Chagas Disease a Public Health Threat in the Americas & Beyond*, Veyrier du Lac.

Fonseca, M.L. et al., 2009. *MIGHEALTHNET - Relatório sobre o Estado da Arte em Portugal* Centro de Estudos Demográficos, ed., Lisboa: Universidade de Lisboa.

de Freitas, J.M. et al., 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2(3), pp. 226-235. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1434789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado em 22 de Agosto, 2011].

Gascon, J., Bern, C. & Pinazo, M.-J., 2009. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), pp.22-27. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646412> [Consultado em 20 de Junho, 2011].

Gascón, J. & Pinazo, María Jesús, 2008. Control de la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en España: principal reto de la patología importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(10), pp.607-608.

Generalitat de Catalunya - Departament de Salut, 2010. *Protocol de cribratge i diagnòstic de malaltia de Chagas en dones embarassades llatinoamericanes i en els seus nadons*, Barcelona.

Gironès, N. & Fresno, M., 2003. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in Parasitology*, 19(1), pp.19-22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488221>.

González-Tomé, M.I., Rojo, P. & Flores-Chávez, M., 2008. Enfermedad de Chagas. Prevención de la infección en el recién nacido. *Anales de Pediatría Continuada*, 6(6), pp.369-374. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S169628180875604X> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].

Guedes, P.M. da M. et al., 2009. Molecular markers for clinical forms of Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(Supl. II), pp. 55-60.

- Guerri-Guttenberg, R.A. et al., 2008. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *European Heart Journal*, 29(21), pp.2587-2591. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840880> [Consultado em 5 de Setembro, 2011].
- Góis, P., Marques, J.C. & Padilla, B., 2009. Segunda ou terceira vaga ? As características da imigração brasileira recente em Portugal. *Revista Migrações*, 5, pp.111-133.
- Hermann, E. et al., 2004. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Is Associated with Maternal Enhanced Parasitemia and Decreased Production of Interferon-gamma in Response to Parasite Antigens. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(7), pp.1274-1281. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031797>.
- Instituto Nacional de Estatística, 2010. *Revista de Estudos Demográficos* Instituto Nacional de Estatística, ed., Lisboa.
- International Organization for Migration, 2004. *Migration from Latin America to Europe: Trends and Policy Challenges*, A. Pellegrino, ed., Uruguay: International Organization for Migration.
- International Symposium, 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(Suppl 1), pp.429-32. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677771>.
- Jackson, Yves et al., 2009. Congenital Transmission of Chagas Disease in Latin American Immigrants in Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), pp.601-603. Disponível em: <http://www.cdc.gov/eid/content/15/4/601.htm> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Jr., A.R., Rassi, S.G. & Rassi, A., 2001. Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 76(1), pp.86-96. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403051>.
- Laranja, Francisco S., Dias, Emmanuel & Nobrega, Genrad, 1948. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 46(2), pp.473-529.
- Le Loup, G. et al., 2009. Maladie de Chagas : formes cliniques et prise en charge en zone non endémique. *Presse Médicale*, 38(11), pp.1654-66. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349139> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- López-Chejade, P. et al., 2005. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población procedente de zona endémica en Barcelona. Valoración de las pruebas de diagnóstico utilizadas. *Enfermedades Emergentes*, 8(Supl. 1), pp.32-34.
- Mady, C. & Nacrueth, R., 1995. Natural history of chronic Chagas' heart disease: prognosis factors. *São Paulo Medical Journal*, 113(2), pp.791-796.

- Magnani, C., Dias, J.C.P. & Gontijo, E.D., 2009. Como as ações de saúde pensam o homem e como o homem as repensa : uma análise antropológica do controle da doença de Chagas. *Cadernos de Saúde Pública*, 25(9), pp.1947-1956.
- Marin-Neto, J. Antonio et al., 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(June Suppl. I), pp.319-324. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753491>.
- Maroco, J., 2007. *Análise Estatística com utilização do SPSS* 3a ed. Edições Sílabo, ed., Lisboa: Edições Sílabo.
- Marques, D.S. de O. et al., 2006. Avaliação de Pacientes Assintomáticos com Forma Crônica da Doença de Chagas através da Análise do Eletrocardiograma Dinâmico, Ecocardiograma e do Peptídeo Natriurético Tipo B. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 87(3), pp.336-343.
- Maudlin, I., Holmes, P.H. & Miles, Michael A., 2004. *The Trypanosomiasis*, 1st ed. CABI Publishing. ed., Trowbridge: Cromwell Press.
- Medei, E.H. et al., 2008. Envolvimento de Auto-Anticorpos na Fisiopatologia da Doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 91(4), pp.281-286.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, 2007. *Norma Técnica de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas*, El Salvador.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005. *Real Decreto 1088/2005*, España.
- Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009. *Chagas Disease and Blood Donation*, España.
- Ministério da Saúde, 2001. Despacho n.º 25 360/2001 (2.^a série), Portugal.
- Ministério dos Negócios Estrangeiros, 2003. Decreto n.º 40/2003, Portugal.
- Mor, G., 2006. *Immunology of Pregnancy*, 1st ed., Mor, G., ed., New York: Landes Bioscience / Eureka.com.
- Morel, C.M., 1999. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1(May 1900), pp.3-16. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677688>.
- Muñoz, Jose et al., 2006. Características clínicas de pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi*. *Enfermedades Emergentes*, 8(Supl 1), pp.42-44.
- Muñoz, Jose, Gómez i Prat, J., et al., 2009. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta tropica*, 111(1), pp.51-5. Disponível em:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426663> [Consultado em 15 de Agosto, 2011].
- Muñoz, Jose et al., 2007. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), pp.1161-2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17655897> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Muñoz, José, Coll, O., et al., 2009. Prevalence and Vertical Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection among Pregnant Latin American Women Attending 2 Maternity Clinics in Barcelona, Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 48(15), pp.1736-1740.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001. *Specifications for Immunological Testing for Infectious Diseases; Approved Guideline* Second Edi., Wayne, PA.
- Nisida, I.V. et al., 1999. A Survey of Congenital Chagas' Disease, carried out at Three Health Institutions in São Paulo City, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41(5), pp.305-311. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602545>.
- Organización Panamericana de la Salud, 2006. *Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas*, J. Jannin & R. Salvatella, eds., Montevideo: Organización Panamericana de la Salud.
- Otani, M.M. et al., 2009. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion*, 49(6), pp.1076-1082.
- Padilla, B. & Ortiz, A., 2009. Uma primeira aproximação ao perfil sócio-demográfico dos latino-americanos em Portugal. *Revista Migrações*, 5(Migrações entre Portugal e a América Latina), pp.87-110.
- Padilla, B. & Peixoto, J., 2007. Latin American Immigration to Southern Europe. *Migration Information Source*. Disponível em: <http://www.migrationinformation.org/Feature/display.cfm?id=609> [Consultado em 26 de Fevereiro, 2011].
- Panzer, F. et al., 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerging Infectious Diseases*, 10(3), pp.438-46. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18328454>.
- Piacenza, L. et al., 2009. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), pp.415-421. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616990> [Consultado em 4 de Agosto, 2011].
- Pimentel, D., 2006. Terra de Migrações. In Instituto Geográfico Português, ed. *Atlas de Portugal*. pp. 98-103.

- Pinazo, María Jesús et al., 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterología y Hepatología*, 33(3), pp.191-200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837482> [Consultado em 14 de Setembro, 2011].
- Pires, R.P., 2010. O primeiro Atlas das Migrações. *Fundação Calouste Gulbenkian Newsletter*, 117, pp.6-9.
- Piron, M. et al., 2008. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*, 48(9), pp.1862-1868. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18522707> [Consultado em 15 de Agosto, 2011].
- Pérez-López, F.R. & Chedraui, P., 2010. Chagas disease in pregnancy: a non-endemic problem in a globalized world. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 282(6), pp.595-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559648> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Pérez-Molina, J.A. et al., 2009. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), pp.1139-47. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819909> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Raposo, P. & Togni, P., 2009. *Fluxos Matrimoniais Transnacionais entre Brasileiras e Portugueses: Género e Imigração*, Observatório da Imigração.
- Rassi, A. & Marin-Neto, José Antonio, 2010. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), pp.1388-1402. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979> [Consultado em 21 de Julho, 2011].
- Reiche, E.M.V. et al., 1996. Doença de Chagas congênita : epidemiologia , diagnóstico laboratorial , prognóstico e tratamento. *Jornal de Pediatria*, 72(3), pp.125-132.
- Rueda, A.B. et al., 2009. *Enfermedad de Chagas Importada. Protocolo de Actuación en la Comunitat Valenciana* Generalitat Valenciana - Conselleria de Sanitat, ed., Valencia.
- Santos, Luiz A., de C., Moraes, C. & Coelho, V.S.P., 1991. A Hemoterapia no Brasil de 64 a 80. *PHYSIS - Revista de Saúde Coletiva*, 1(1), pp. 161-182.
- Schmunis, G. a, 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(Suppl I), pp.75-85. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891282>.
- Schmunis, G. a & Yadon, Z.E., 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2), pp.14-21. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932071> [Consultado 21 de Julho, 2011].

- Schofield, C.J., 2000. *Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health*, World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme, ed., Genève: World Health Organization.
- Schofield, C.J. & Galvão, C., 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2-3), pp.88-100. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X0900028X> [Consultado em 22 de Agosto, 2011].
- Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2005. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(Supl. III), pp.1-29.
- Serviço de Estrangeiros e Fronteiras, 2009. *Relatório de Imigração Fronteiras e Asilo*, Oeiras.
- Serviço de Estrangeiros e Fronteiras, 2010. *Relatório de Imigração Fronteiras e Asilo*, Oeiras.
- Sicuri, E. et al., 2011. Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin American women and of their infants in a non endemic area. *Acta tropica*, 118(2), pp.110-117. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396345> [Consultado em 15 de Agosto, 2011].
- Silva, C.C.A., 2002. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 24(janeiro/fevereiro), pp.68-72.
- Soares, M.B., Pontes-De-Carvalho, L. & Ribeiro-Dos-Santos, R., 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73(4), pp.547-59. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11743602>.
- Soto, C.D.A. et al., 2003. *Trypanosoma cruzi* Infection Modulates In Vivo Expression of Major Histocompatibility Complex Class II Molecules on Antigen-Presenting Cells and T-Cell Stimulatory Activity of Dendritic Cells in a Strain-Dependent Manner. *Infection and Immunity*, 71(3), pp.1194-1199.
- de Sousa, M.A., 1999. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1(3), pp.205-10. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677717>.
- de Souza, W., 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, pp.17-36. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677689>.
- Stuart, K. et al., 2008. Kinetoplastids : related protozoan pathogens , different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), pp.1301-1310.

- Sánchez Negrette, O., Mora, M.C. & Basombrío, M.A., 2005. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, 115(6), pp.e668-72. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930194> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Teixeira, A.R.L., Nascimento, R.J. & Sturm, Nancy R., 2006. Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(5), pp.463-491. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17072450>.
- Tomazi, L. et al., 2009. Haplotype distribution of five nuclear genes based on network genealogies and Bayesian inference indicates that *Trypanosoma cruzi* hybrid strains are polyphyletic. *Genetics and Molecular Research*, 8(2), pp.458-76. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19551633>.
- Torrico, F., 2011. Rationale and design of a proof-of-concept phase II clinical study of E1224, a new drug candidate for chronic chagas disease. *Tropical Medicine & International Health*, 16(Sup. I), pp.21-22.
- Torrico, Faustino et al., 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), pp.201-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993634>.
- Vago, A.R. et al., 2000. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease. *The American Journal of Pathology*, 156(5), pp.1805-1809. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010650523> [Consultado em 18 de Dezembro, 2011].
- Vallejo, G.A. et al., 2009. *Trypanosoma cruzi* population variability in Colombia: possible co-infection in different vector species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(Sup. II), pp.38-45.
- Velarde-Rodríguez, M. et al., 2009. Need for comprehensive health care for *Trypanosoma cruzi* infected immigrants in Europe. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(Sup. II).
- Villar, J.C. et al., 2009. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection (Review). *The Cochrane Library*, (1).
- Viotti, R. et al., 2011. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), p.e1314. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167788&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Consultado em 14 de Janeiro, 2012].
- Voet, D. & Voet, J.G., 2004. *Biochemistry* 3rd ed. Wiley International Edition, ed., D. Harris & P. Fitzgerald, eds., United States of America: Wiley International Edition.

- WHO Expert Committee, 2002. *Control of Chagas Disease*, Geneva.
- Wilson, L.S. et al., 2008. Cost-effectiveness of implementation methods for ELISA serology testing of *Trypanosoma cruzi* in California blood banks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(1), pp.53-68. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606764>.
- World Health Organization, 2009a. *Chagas disease: control and elimination*, Genève.
- World Health Organization, 2010. *Chagas disease : control and elimination*, Genève.
- World Health Organization, 2008. *Chagas disease : control and elimination Report of the Secretariat*, Genève.
- World Health Organization, 2009b. *Control and prevention of Chagas disease in Europe*, Geneva.
- World Health Organization, 2007a. *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*, Buenos Aires.
- World Health Organization, 2007b. *WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests*, Geneva.
- World Health Organization, 2009c. *WHO Model Formulary* 2008th ed. M. C. Stuart, M. Kouimtzi, & S. R. Hill, eds., Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization, 2011. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*, Genève. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21438440>.
- Zauza, P.L. & Borges-Pereira, J., 2001. Níveis séricos de IgG anti-*Trypanosoma cruzi* na evolução da cardiopatia chagásica crônica, no período de 10 anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(5), pp.399-405.
- Zingales, B. et al., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.1051-1054. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>.

6 Lista de Tabelas, Ilustrações, Gráficos e Equações

6.1 Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características celulares de <i>T. cruzi</i> , segundo os autores de Souza, Teixeira <i>et al.</i> e Alberts <i>et al.</i>	4
Tabela 2 – Características estruturais das formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> segundo os autores De Sousa, Chagas, Marin-Neto e Maudlin. Imagens extraídas de Bern <i>et al.</i> 2007, de http://www.fcfrp.usp.br/ e de http://dna.kdna.ucla.edu/	8
Tabela 3 – Testes comerciais disponíveis em Espanha, segundo dados do <i>Ministerio de Sanidad y Política Social</i>	30
Tabela 4 – Posologia em adultos e efeitos adversos de Nifurtimox e Benznidazol segundo a publicação de 2009 do <i>WHO Model Formulary</i> (World Health Organization, 2009c)	32
Tabela 5 - Posologia recomendada para o tratamento pediátrico com Benznidazol e Nifurtimox, segundo o autor González-Tomé e a <i>Comisión de Medicamentos de la Fundación CONAMED</i>	36
Tabela 6 – Estimativa de infectados em área não endêmica, segundo os autores Schmunis e Yadon e a Organização Mundial de Saúde.	42
Tabela 7 – Informações cedidas pelas casas comerciais contactadas.	49
Tabela 8 – Motivo de inclusão no estudo.	59
Tabela 9 – Frequência de respostas afirmativas pelas participantes quanto a recepção de órgão por transplante ou sangue por transfusão na América-latina, nacionalidade materna latino-americana, residência e desenvolvimento de actividade profissional em área endêmica.	60
Tabela 10 – País de origem das participantes nascidas em área endêmica.	61
Tabela 11 – Localidade de nascimento das participantes recrutadas nascidas no Brasil, por estado.	64
Tabela 12 – Relação entre o número e tipo de respostas das participantes quanto à realização de análises para diagnóstico da Doença de Chagas e à existência de familiares diagnosticados com a mesma.	69
Tabela 13 – Frequência de respostas obtidas quanto à intenção de dar à luz em Portugal no que respeita à presente gravidez.	70
Tabela 14 – Resultados obtidos nas amostras com dois ensaios de rastreio utilizados.	73
Tabela 15 – Melhores ensaios ELISA comercializados em Portugal de acordo com informação dos fabricantes sobre sensibilidade, especificidade e preço.	78
Tabela 16 - Comparação entre os <i>kits</i> de ELISA da <i>REM</i> e <i>Ortho Clinical Diagnostics</i> quanto à sua utilização.	80

Tabela 17 – Teste de normalidade para as variáveis a comparar.....	83
Tabela 18 – Resultados obtidos com o teste de hipóteses <i>Wilcoxon</i>	83

6.2 Lista de Ilustrações

Ilustração 1 – Sinal de Romaña (extraído de http://www.etsu.edu/com/).	9
Ilustração 2 – Principais espécies de triatomíneos transmissoras de <i>T. cruzi</i> , por país, em área endémica segundo dados de Schofield e da Organização Mundial de Saúde, publicados em 2000, 2002 e 2007.....	14
Ilustração 3 – Metodologia de um ensaio ELISA indirecto adaptado de Burmester e Pezzutto, 2005.....	24
Ilustração 4 – Recomendações da <i>American Medical Association</i> para o tratamento antiparasitário de Doença de Chagas, segundo o autor Bern em 2007.	34
Ilustração 5 – Metodologia de estudo.....	52
Ilustração 6 – Cronologia da Implementação do Estudo	54
Ilustração 7 – – Mapa estadual do Brasil, com os estados de onde são originárias as participantes do estudo preenchidos a amarelo.	63

6.3 Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Prevalência da Doença de Chagas nos países endémicos segundo dados de 2006 da <i>Organización Panamericana de la Salud</i>	12
Gráfico 2 – Percentagem de participantes recrutadas em cada uma das entidades hospitalares.	57
Gráfico 3 - Frequência das idades das participantes.	58
Gráfico 4 – Percentagem de participantes nascidas em cada estado brasileiro.	62
Gráfico 5 – Percentagem de respostas quanto à classificação do meio habitacional das participantes que residiram em área endémica.	66
Gráfico 6 – Comparação entre a profissão exercida no país de origem e a exercida em Portugal, por cada participante.....	67
Gráfico 7 – Frequências observadas da semana de gravidez em que se encontram as participantes no dia em que são recrutadas.	71
Gráfico 8 – Percentagem de cada resposta dada pelas participantes quanto à intenção de ter mais filhos em Portugal.	72

6.4 Lista de Equações

Equação 1 - Cálculo do sinal para cada amostra.	82
--	----

7 Anexos

7.1 Anexo 1 – Questionário de Selecção de Participantes (Grupo I)

**ESTUDO PILOTO SOBRE A PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM GRÁVIDAS
LATINO-AMERICANAS EM PORTUGAL**

IDENTIFICAÇÃO DA PARTICIPANTE



Iniciais do primeiro e último nomes:

--	--

Número de processo: _____
(A preencher pelo profissional de saúde)

Data: _____

QUESTIONÁRIO

Grupo I

Escolha dos participantes

1- Nasceu na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não

Se respondeu “sim”, indique o país, o estado ou província e a cidade onde nasceu, e passe para a questão 3.

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

2- Realizou viagem por mais de um mês a algum país da América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não

Se respondeu “sim”, indique o(s) país(es), o(s) estado(s) ou província(s) e a(s) cidade(s).

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

3- É filha de mãe que tenha vivido na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não

4- Recebeu transfusão de sangue na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não	Não sei

Se respondeu “sim”, indique o país, o estado ou província e a cidade.

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

5- Recebeu algum órgão por transplante na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não	Não sei
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Se respondeu “sim”, indique o país, o estado ou província e a cidade.

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

6- Já foi residente na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Se respondeu “sim”, indique o(s) país(es), o(s) estado(s) ou província(s) e a(s) cidade(s), e responda à alínea a).

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

a) Viveu em meio rural ou urbano?

Assinale com uma cruz.

Rural	Urbano	Ambos
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

7- Alguma vez trabalhou na América Latina?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Se respondeu “sim”, indique o(s) país(es), o(s) estado(s) ou província(s) e a(s) cidade(s), e responda às alíneas a) e b).

País: _____

Estado / Província: _____ Cidade: _____

a) Qual a sua profissão no continente americano?

b) Qual a sua profissão em Portugal? (se desempregado, refira-o como tal)

**SE RESPONDEU “NÃO” A TODAS AS PERGUNTAS ATÉ AGORA, O SEU QUESTIONÁRIO
TERMINA AQUI**

7.2 Anexo 2 – Consentimento Informado

CONSENTIMENTO INFORMADO



Título do Estudo: Estudo Piloto sobre a Prevalência da Doença de Chagas em Grávidas Latino-americanas em Portugal

Promotor: Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa – Unidade de Ensino e Investigação de Clínica das Doenças Tropicais

Investigadores: Jorge Seixas, Marcelo Silva, Ana Rita Ferrão

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é transmitida durante a picada de um insecto que existe apenas na América central e do Sul. Existem outras formas importantes de transmissão da doença, de mãe para filho e por transfusão de sangue ou transplante. Estamos a estudar a existência dessa doença em Portugal. Para tal precisamos de uma análise ao sangue de grávidas imigrantes dessa região em Portugal. Apresentamos em seguida toda a informação sobre o estudo, para decidir se quer ou não participar. Esta é uma decisão pessoal. Se tiver alguma questão ao ler este documento, pode colocá-la a quem lho forneceu, ou contactar qualquer um dos investigadores.

A) OBJECTIVO DO ESTUDO

Esta doença pode provocar problemas graves cardíacos e intestinais. Os estudos publicados sobre esta doença em Portugal são muito poucos. Saber se uma grávida tem doença de Chagas é muito importante para evitar a transmissão à criança.

B) PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se aceitar fazer parte deste estudo terá que preencher um questionário. Se responder “não” a todas as questões do grupo I, será excluída do estudo e não terá que continuar os procedimentos seguintes. Para saber se já foi infectada vamos precisar de uma pequena parte do sangue que vai ser colhido quando fizer análises para a rotina pré-natal ou no momento do parto. Mais tarde um dos investigadores levará a amostra para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, onde será feita a análise. O serviço em que se encontra será contactado se o seu resultado for positivo, para que possam tratá-la se necessário. Para assegurar que a sua criança é devidamente acompanhada no caso do seu resultado ser positivo, pedimos-lhe que permita também que o sangue do cordão umbilical seja colhido durante o parto.

C) PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

É totalmente sua a decisão de participar ou não. Se não quiser participar isto não mudará o seu seguimento médico.

D) RISCOS E DESCONFORTOS

Para participar neste estudo, o risco e desconforto que existe é mínimo, ligado apenas à colheita de sangue.

E) BENEFÍCIOS

Para si apenas haverá benefício se estiver infectada, pois o serviço será avisado dessa situação para que possa ser corretamente acompanhada. Para a população, o benefício que há neste estudo é alertar as autoridades para a importância da doença de Chagas em Portugal e permitir que se tomem medidas de saúde pública adequadas.

F) COMPENSAÇÃO

Não terá que pagar nada para fazer parte deste estudo, nem será paga para tal.

G) CONFIDENCIALIDADE

Os seus dados pessoais serão mantidos confidenciais. Os questionários vão ter um código e não o seu nome. Apenas o investigador terá acesso aos nomes correspondentes aos códigos, que serão guardados por ele. Os seus dados só serão comunicados ao serviço em que se encontra caso esteja infectada.

H) PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão comunicados às autoridades de saúde, mostrados em reuniões científicas e publicados em revistas científicas, mas não terão dados confidenciais.

Prevalência de Doença de Chagas em Gestantes Latino-americanas em Portugal e suas Implicações

I) DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Fui convidada a participar no estudo sobre Doença de Chagas, e sei que envolve a utilização de alguns dados pessoais que serão mantidos confidenciais, a utilização de uma amostra obtida na colheita de sangue que realizo neste serviço e também uma amostra de sangue do cordão umbilical obtida no parto. Fui informada de que os riscos são mínimos, e sei que os benefícios directos só existem se estiver infectada. Foi-me dado o nome do investigador com quem posso contactar. Li toda a informação deste documento, ou foi-me lida. Tive oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo. Autorizo voluntariamente a minha participação neste estudo.

Nome da participante: _____ Data: _____

Assinatura da participante (cruz se iletrada) _____

Testemunha (caso o participante seja iletrada): _____

Assinatura do investigador _____

Contacto: Rua da Junqueira, nº.100, 1349-008 Lisboa
Telefone: 21 365 26 61
Fax: 21 363 21 05
e-mail: jseixas@ihmt.unl.pt

7.3 Anexo 3 – Questionário para Recolha de Dados Epidemiológicos (Grupo II)

**ESTUDO PILOTO SOBRE A PREVALÊNCIA DA DOENÇA DE CHAGAS EM GRÁVIDAS
LATINO-AMERICANAS EM PORTUGAL**

IDENTIFICAÇÃO DA PARTICIPANTE

Iniciais do primeiro e último nomes:

--	--

Número de processo: _____
(A preencher pelo profissional de saúde)

Data: _____



Grupo II

Participantes incluídas

1- Data de nascimento (dia/mês/ano): ____/____/____

2- Alguma vez fez análises para saber se tinha Doença de Chagas?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não	Não sei

Se respondeu “sim”, responda à alínea a).

a) Qual o resultado da análise?

Assinale com uma cruz.

Positiva	Negativa	Não cheguei a saber

3- Tem familiares com Doença de Chagas?

Sim	Não	Não sei

4- Está grávida de quanto tempo? _____ semanas.

5- Pretende dar à luz em Portugal?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não	Ainda não decidi

6- Pretende ter mais filhos em Portugal?

Assinale com uma cruz.

Sim	Não	Não sei

7.4 Anexo 4 – Procedimento do Ensaio ELISA da REM

- Colocação do *kit* e amostras à temperatura ambiente, aproximadamente 30 a 60 minutos;
- Determinação do número de poços necessários para o ensaio;
- Realização do mapa da placa;
- Preparação da solução de lavagem diluída 1X com água destilada;
- Adição de 200µL de diluente de amostra a todos os poços;
- Adição de 20µL de cada amostra e controlos de acordo com o mapa da placa;
- Verificação da mudança de cor após adição das amostras e controlos;
- Incubação a 37°C durante 30 minutos;
- Aspiração e lavagem de todos os poços por 5 vezes utilizando a solução de lavagem;
- Adição de 200µL de conjugado em todos os poços;
- Incubação a 37°C durante 30 minutos;
- Aspiração e lavagem de todos os poços por 5 vezes utilizando a solução de lavagem;
- Adição de 200µL de substrato a todos os poços;
- Incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 15 minutos;
- Adição de 100µL de solução bloqueadora a todos os poços;
- Leitura de todos os poços a um comprimento de onda de 450nm;
- Aplicação de critérios de controlo de qualidade segundo as instruções do fabricante;
- Interpretação de resultados;
- Cálculo do sinal.

7.5 Anexo 5 – Procedimento do Ensaio ELISA da *Ortho Clinical*

Diagnostics

- Colocação do *kit* e amostras à temperatura ambiente, aproximadamente 30 a 60 minutos;
- Determinação do número de poços necessários para o ensaio;
- Realização do mapa da placa;
- Preparação da solução de lavagem diluída 1X com água destilada;
- Adição de 200µL de diluente de amostra a todos os poços;
- Adição de 20µL de cada amostra, controlo e calibrador de acordo com o mapa da placa;
- Verificação da mudança de cor após adição das amostras, controlos e calibrador;
- Incubação a 37°C durante 60 minutos;
- Aspiração e lavagem de todos os poços por 5 vezes utilizando a solução de lavagem;
- Adição de 200µL de conjugado em todos os poços excepto no correspondente ao branco;
- Monitorização da omissão do conjugado realizando uma leitura de todos os poços excepto o correspondente ao branco a um comprimento de onda de 490nm;
- Interpretação da leitura segundo as instruções do fabricante;
- Incubação a 37°C durante 30 minutos;
- Preparação da solução substrato segundo as instruções do fabricante, e armazenamento ao abrigo da luz;
- Aspiração e lavagem de todos os poços por 5 vezes utilizando a solução de lavagem;
- Adição de 200µL de solução substrato a todos os poços;
- Incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos;
- Adição de 50µL de ácido sulfúrico 4N a todos os poços;
- Leitura de todos os poços a um comprimento de onda de 490nm;
- Aplicação de critérios de controlo de qualidade segundo as instruções do fabricante;
- Interpretação de resultados;
- Cálculo do sinal.